

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

Am

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
23. Mai 2002 (23.05.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/40668 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/12,  
C07K 14/47, 16/18, A61K 48/00, 38/17

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/12545

(22) Internationales Anmeldedatum:  
30. Oktober 2001 (30.10.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 56 687.1 15. November 2000 (15.11.2000) DE  
100 59 595.2 30. November 2000 (30.11.2000) DE

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): APOTECH RESEARCH & DEVELOPMENT LTD. [CH/CH]; 84, Rue de Rhone, CH-1204 Genf (CH).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): TSCHOPP, Jürg [CH/CH]; 10, ch. des Fontannins, CH-1066 Epalinges (CH). MARTINON, Fabio [IT/IT]; Valentin 30, CH-1004 Lausanne (CH).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(74) Anwälte: GRAF VON STOSCH, Andreas usw.; Bosch, Graf von Stosch, Jehle, Theatinerstrasse 8, 80333 München (DE).

(54) Title: PROTEINS AND DNA SEQUENCES UNDERLYING THESE PROTEINS USED FOR TREATING INFLAMMATIONS

(54) Bezeichnung: PROTEINE UND DEN PROTEINEN ZUGRUNDELIEGENDE DNA-SEQUENZEN MIT FUNKTION BEI ENTZÜNDUNGSEREIGNISSEN

(57) Abstract: The invention relates to DNA sequences, which code for at least one PYD domain, to expression vectors, which contain DNA sequences of this type, to host cells, which are transformed using expression vectors of this type, to purified gene products of said DNA sequences, to antibodies directed against said gene products, and to methods for isolating and/or expressing said gene products. The invention also relates to the use of said DNA sequences or of their gene products for treating inflammations.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die für mindestens eine PYD-Domäne codieren, Expressionsvektoren, die derartige DNA-Sequenzen enthalten, Wirtszellen, die mit derartigen Expressionsvektoren transformiert sind, aufgereinigte Genprodukte der vorgenannten DNA-Sequenzen, Antikörper gegen für vorgenannten Genprodukte, sowie Verfahren zur Isolierung und/oder zur Expression der vorgenannten Genprodukte. Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der vorgenannten DNA-Sequenzen oder von deren Genprodukten zur Behandlung von Entzündungsereignissen.

WO 02/40668 A2

**Proteine und den Proteinen zugrundeliegende DNA-Sequenzen  
mit Funktion bei Entzündungsereignissen**

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die für  
mindestens eine PYD-Domäne codieren, Expressionsvektoren,  
die derartige DNA-Sequenzen enthalten, Wirtszellen, die  
mit derartigen Expressionsvektoren transformiert sind,  
aufgereinigte Genprodukte der vorgenannten DNA-Sequenzen,  
10 Antikörper gegen die vorgenannten Genprodukte, Verfahren  
zur Isolierung und/oder zur Expression der vorgenannten  
Genprodukte und die Verwendung der DNA-Sequenzen oder der  
Genprodukte zur Behandlung von Entzündungsereignissen.
- 15 Proteine weisen einen modularen Aufbau auf, wobei die  
einzelnen Abschnitte von Proteinen strukturell und ggf.  
funktionell selbständig sind. Diese Abschnitte werden  
Domänen genannt. Proteine mit modularem Aufbau treten  
beispielsweise bei Proteinen der apoptotischen  
20 Signaltransduktionskette auf (Aravind et al. (1999) TIBS,  
24, 47-53; Hofmann (1999) Cell. Mol. Life. Sci., 55,  
1113-28). Für die Klasse der apoptotischen  
Signaltransduktionsproteine wären drei Familien von  
Domänen zu nennen, nämlich die Familie der Todesdomänen

- (DD), die Familie der Todeseffektordomänen (DED) und die Familie der Caspase-Rekrutierungsdomäne (CARD), die alle entfernt miteinander verwandt sind und auch alle einer Superfamilie angehören, die typischerweise in ihrer 3-dimensionalen Struktur ein Bündel von sechs Helices ("six helix bundle") bildet. Zu jenen Proteinen, die eine Todesdomäne, Todeseffektordomäne und/oder eine CARD-Domäne aufweisen, gehören beispielsweise die Proteine FLIP, CARDIAK-RIP2, ARC, Bcl10, DEDD, wie in den Veröffentlichungen von Irmeler et al., 1997, Nature, 388, 190-195; Koseki et al. 1998, Proct. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 5156-60; McCarthy et al. 1998, J. Biol. Chem. 273, 16968-16975; Stegh, et al., 1998, EMBO J., 17, 5974-86; Thome et al., 1999, J. Biol. Chem., 274, 9962-8 gezeigt.
- Während also zahlreiche Proteine, die Domänen der strukturellen Superfamilie (Bündel aus sechs Helices) aufweisen, in intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse verwickelt sind, insbesondere aufgrund ihrer Fähigkeit zur Assoziierung mit vor- bzw. in der Signaltransduktion nachgeschalteten Proteinen, sind die an der Entzündungsreaktion beteiligten Proteine, ebenso wie die Form der Signalübertragung bei inflammatorischen Reaktionen weitgehend unbekannt.
- Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es einerseits, solche Proteine (mit ihren Aminosäuresequenzen) und ggf. den zugrundeliegenden DNA-Sequenzen zu identifizieren, die an der Entzündungsreaktion beteiligt sind, oder aus anderem Zusammenhang bekannten Proteinen eine Funktion in der Entzündungsreaktionskaskade zuzuweisen und andererseits, durch Bestimmung der Signaltransduktionsmechanismen, Stoffe zur Behandlung inflammatorischer Reaktionen zur Verfügung zu stellen.
- Zur Lösung dieser Aufgabe haben die Erfinder zunächst festgestellt, daß PYD-Domänen eine entscheidende Rolle bei der intrazellulären Weitergabe eines inflammatorischen Signals spielen. Erfindungsgemäß wurde

festgestellt, daß die Domäne PYD ebenfalls die Struktur des Bündels aus 6 Helices aufweist und daß sie in ihrem Interaktionspotential mit den insoweit strukturell verwandten Domänen DED, DD oder CARD vergleichbar ist.

5    Damit wird erfindungsgemäß eine vierte Familie von "Sechs-Helix-Bündel"-Domänen (hier als Domäne "PYD" bezeichnet), die als Bestandteil von nativen Proteinen auftritt, zur Verfügung gestellt.

10    Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher DNA-Sequenzen, die für ein Protein mit mindestens einer PYD-Domäne codieren, einschließlich aller funktionshomologen Derivate, Fragmente oder Allele. Insbesondere sind alle DNA-Sequenzen mit umfaßt, die mit den erfindungsgemäßen

15    DNA-Sequenzen hybridisieren, einschließlich der jeweils im Doppelstrang komplementären Sequenzen (Anspruch 1).

In Hinblick auf die Hybridisierungsbedingungen wird im einzelnen offenbart, dass homologe oder sequenzverwandte DNA-Sequenzen aus allen Säugerspezies, einschließlich

20    Mensch, nach gängigen Verfahren durch Homologie-Screening durch Hybridisierung mit einer Probe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen oder Teilen davon isoliert werden. Unter funktionellen Äquivalenten sind auch Homologe der nativen PYD-Domänen enthaltenden

25    Sequenzen, bspw. der in Figur 1 dargestellten Sequenzen, beispielsweise ihre Homologen aus anderen Mammalia, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA oder RNA der codierenden und nicht-codierenden DNA-Sequenz zu verstehen.

30    Zur Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide der konservierten Bereiche, die auf dem Fachmann bekannte Weise ermittelt werden können, verwendet. In jedem Fall wird die Verwendung und Funktion von mindestens 15, vorzugsweise mindestens 20 AS langen Nukleotidabschnitten

35    (auch als solche offenbart) der in Figur enthaltenen Nukleotidsequenzen als Primer für PCR-Reaktionen oder als

Oligonukleotide auf DNA-Chips offenbart. Es können aber auch längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure-Sequenz (Oligonukleotid, längeres Fragment oder vollständige Sequenz) bzw. je nachdem, welche Nukleinsäureart (DNA oder RNA) für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca. 10 °C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge. Unter Standardbedingungen sind beispielsweise, je nach Nukleinsäure, Temperaturen zwischen 42 und 58 °C in einer wäßrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 X SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50% Formamid, wie beispielsweise 42 °C in 5 x SSC, 50% Formamid, zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20 °C bis 45 °C, bevorzugt zwischen etwa 30 °C bis 45 °C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 30 °C bis 55 °C, bevorzugt zwischen etwa 45 °C bis 55 °C. Diese angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik, wie beispielsweise bei Sambrook et al. ("Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989), beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln, beispielsweise abhängig von der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausübel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John

Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden solche erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen offenbart, für die sich ein Signifikanzniveau von  $p < 10^{-2}$  ergibt, wenn die PYD-Domäne einer Ziel-DNA-Sequenz (also einer potentiell erfindungsgemäßen DNA-Sequenz) mit einem Suchprofil nach Figur 3 verglichen wird (Anspruch 2). In Hinblick auf die diesbezügliche experimentelle Vorgehensweise wird auf die Veröffentlichung von Bucher et al. (1996, Computer Chem., 20, 3-24) und auf die entsprechenden Erläuterungen in der offengelegten deutschen Patentanmeldung DE 197 13 393.2-41 verwiesen, die beide insoweit Bestandteil der Offenbarung der vorliegenden Anmeldung sind.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden DNA-Sequenzen offenbart, deren Genprodukt eine der Aminosäuresequenzen (für eine PYD-Domäne), wie in Figur 6 wiedergegeben, einschließlich aller funktionshomologen Derivate, Allele oder Fragmente, enthält. Vorteilhafterweise weisen derartige Derivate oder Allele eine Sequenzhomologie von mindestens 80%, vorzugsweise von mindestens 90% und noch stärker bevorzugt von mindestens 95% und am stärksten bevorzugt von mindestens 98% mit der vorgenannten Sequenz auf. Auch mit diesen erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen hybridisierende DNA-Sequenzen (einschließlich der Sequenzen des komplementären DNA-Stranges) sind mitoffenbart (Anspruch 3).

Bevorzugt sind weiterhin DNA-Sequenzen, die eine der in Figur 1 angegebenen (c)DNA-Sequenzen enthalten (Anspruch

4). Im Zuge der erfindungsgemäßen Feststellungen wurde nämlich herausgefunden, daß erfindungsgemäße DNA-Sequenzen für zahlreiche Proteine (Aminosäuresequenzen) mit einer PYD-Domäne codieren, die insbesondere auch am

5 ggf. pathophysiologischen Inflammationsgeschehen beteiligt sind. Diese DNA-Sequenzen (einschließlich der entsprechenden Aminosäuresequenzen) sind in Fig. 1 dargestellt. Hierzu gehören, wie in Figur 1 jeweils mit Codierungsnummer dargestellt, die Proteine Pyrin (siehe

10 entsprechende Protein- bzw. cDNA-Sequenzen gemäß Fig. 1, Codierungsnummer 1.2), Pycard (Protein und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.3), Pyc (Proteinsequenz und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.1), NALP1 (Proteinsequenz und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.4), NALP2 ((alter Name

15 Py7) mit Protein- und einer DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.5), NALP3 ((alter Name PY5) mit Proteinsequenz und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.6), NALP4 ((alter Name PY6) mit Proteinsequenz und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.7), NALP5 ((alter Name Py8) mit Proteinsequenz und DNA-

20 Sequenz, Codierungsnummer 1.8), NALP6 ((alter Name PY9) mit Proteinsequenz und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.9), PY10 (mit Protein- und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.10), NALP7 ((alter Name Py11) mit Proteinsequenz und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.11),

25 NALP8 ((alter Name Py12) mit Proteinsequenz und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.12), NALP9 ((alter Name Py13) mit Proteinsequenz und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.13), NALP10 ((alter Name Py14) mit Protein- und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.14), NALP11 ((alter Name

30 Py15) mit Protein- und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.15), Py16 ((von der Maus), mit Proteinsequenz und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.16), NALP13 ((alter Name Py17), mit Protein- und CDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.17), NALP14 ((alter Name Py18), von der Maus, mit

35 Protein- und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.18), NALP15 ((alter Name Py19) mit Protein- und partieller DNA-

Sequenz, Codierungsnummer 1.19), NALP12 ((alter Name Py20), von der Maus, mit Proteinsequenz und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.20). Die vorgenannten Sequenzen sind sämtlich in Figur 1 aufgetragen und dort unter den  
5 vorgenannten Bezeichnungen bzw. den Codierungsnummern auffindbar. Die zusammengehörigen, d. h. unter einer Codierungsnummer zusammengefaßten DNA- und Proteinsequenzen sind jeweils durch gepunktete Linien im Fettdruck von der nächsten Einheit getrennt. Figur 1  
10 umfaßt 22 durchnummerierte Seiten. Damit handelt es sich bei einem weiteren bevorzugten Gegenstand der vorliegenden Erfindung um DNA-Sequenzen, die für eines der in Figur 1 dargestellten Genprodukte (d.h. für eine der in Figur 1 enthaltenen Aminosäuresequenzen) codieren  
15 oder DNA-Sequenzen, die zumindest in einem Abschnitt der Gesamtsequenz für eine der in Figur 1 angegebenen Aminosäuresequenzen codieren (Anspruch 5).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind  
20 Expressionsvektoren, die eine erfindungsgemäße DNA-Sequenz, bspw. wie zuvor offenbart oder gemäß Ansprüchen 1 bis 5 beansprucht, enthalten (Anspruch 6). Derartige erfindungsgemäße Expressionsvektoren (bspw. Plasmide) enthalten neben mindestens einer erfindungsgemäßen DNA-  
25 Sequenz typischerweise auch Promotor-Bereiche und Terminator-Bereiche, ggf. auch Marker-Gene (bspw. Antibiotika-Resistenz-Gene) und/oder Signalsequenzen zum Transport des translatierten Proteins.

30 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Wirtszellen, die mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transformiert wurden (Anspruch 7). Als geeignete Wirtszellen zur Klonierung oder Exprimierung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen kommen Prokaryotenhefen  
35 oder höhere eukaryotische Zellen in Frage. Bei Prokaryoten sind Gram-negative oder Gram-positive Organismen



ausdrücklich eingeschlossen. Zu nennen ist hier E.coli oder Bazillen. Als bevorzugte Wirtszellen zur Klonierung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen werden die Stämme E.coli 294, E.coli B und E.coli X1776 sowie E.coli W3110  
5 offenbart. Bei den Bazillen stehen *Bazillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* oder ähnliche. Wie oben bereits erwähnt, enthalten die Expressionsvektoren typischerweise eine Signalsequenz zum Transport des Proteins in das Kulturmedium, so werden prokaryotische Zellen eingesetzt  
10 werden. Neben Prokaryoten kommen auch eukaryotische Mikroben als Wirtszellen, die mit dem Expressionsvektor transfiziert worden sind, in Frage. So etwa können filamentöse Pilze oder Hefen als geeignete Wirtszellen für die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen codierende Vektoren  
15 eingesetzt werden. Zu nennen ist vor allem *Saccharomyces cerevisiae* oder die gewöhnliche Bäckerhefe (Stinchcomb et al., Nature, 282:39, (1997)).

In einer bevorzugten Ausführungsform werden jedoch zur  
20 Expression von erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen Zellen aus multizellulären Organismen gewählt. Dies geschieht auch vor dem Hintergrund einer möglicherweise erforderlichen Glykosilierung der codierten Proteine. Diese Funktion kann in höheren Eukaryotenzellen - im Vergleich zu  
25 Prokaryotenzellen - in geeigneter Weise ausgeführt werden. Im Prinzip ist jede höhere eukaryotische Zellkultur als Wirtszelle verfügbar, wenn auch Zellen von Säugern, beispielsweise Affen, Ratten, Hamstern oder Menschen, ganz besonders bevorzugt sind. Dem Fachmann ist eine Vielzahl  
30 von etablierten Zelllinien bekannt. In einer keineswegs abschließenden Aufzählung werden die folgenden Zelllinien genannt: 293T (Embryonennierenzelllinie), (Graham et al., J. Gen. Virol., 36:59 (1997)), BHK (Babyhamsternierenzellen), CHO (Zellen aus den  
35 Hamsterovarien), (Urlaub und Chasin, P. N. A. S. (USA)

77:4216, (1980)), HeLa (humane Cervixkarzinomzellen) und weitere Zelllinien.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung sind mit Expressions-  
5 vektoren, die die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen aufweisen, vorzugsweise Zellen des Säugetierimmunsystems, vor allem des humanen Immunsystems, transfiziert (Anspruch 8).

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung sind die  
10 Genprodukte der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen (Anspruch 9). Unter Genprodukten versteht man im Sinne dieser Erfindung sowohl Primärtranskripte, also RNA, vorzugsweise mRNA, als auch Proteine bzw. Polypeptide, insbesondere in aufgereinigter Form (Anspruch 10). Diese Proteine weisen  
15 erfindungsgemäß mindestens eine PYD-Domäne auf und regulieren oder transportieren insbesondere inflammatorische Signale. Bevorzugt ist ein aufgereinigtes Genprodukt dann, wenn es eine der in Figur 7 angegebenen Aminosäuresequenzen (für eine PYD-Domäne), einschließlich  
20 aller funktionshomologen Allele, Fragmente oder Derivate enthält. Zu den erfindungsgemäßen Proteinen gehören aber auch all jene Proteine, die sich von erfindungsgemäßen DNA-Derivaten, DNA-Fragmenten oder DNA-Allelen ableiten.

25 Darüber hinaus können die erfindungsgemäßen Proteine chemisch modifiziert sein. So etwa kann eine Schutzgruppe am N-Terminus vorliegen. Es können Glykosylgruppen an Hydroxyl- oder Aminogruppen angefügt sein, Lipide (insbesondere Fettsäuren, bspw. Myristyl- oder  
30 Palmitylsäure) können kovalent mit dem erfindungsgemäßen Protein verbunden sein, ebenso Phosphate oder Acetylgruppen und ähnliches. Auch beliebige chemische Substanzen, Verbindungen oder Gruppen können auf einem beliebigen Syntheseweg an das erfindungsgemäße Protein  
35 gebunden sein. Auch zusätzliche Aminosäuren, z.B. in Form einzelner Aminosäuren oder in Form von Peptiden oder in

Form von Proteindomänen und ähnliches, können mit dem N- und/oder C-Terminus fusioniert sein. Insbesondere sind hier sogenannte Signal- oder "Leader"-Sequenzen am N-Terminus der erfindungsgemäßen Aminosäuresequenz  
5 vorliegen, die das Peptid cotranslational oder posttranslational in eine bestimmte Zellorganelle oder in den extrazellulären Raum (bzw. das Kulturmedium) führen. Am N- oder am C-Terminus können auch Aminosäuresequenzen vorliegen, die als Antigen die Bindung der  
10 erfindungsgemäßen Aminosäuresequenz an Antikörper erlauben. Zu nennen ist hier insbesondere das Flag-Peptid, dessen Sequenz im Einbuchstabencode der Aminosäuren lautet: DYKDDDDK oder auch His-Tags (mindestens 5, vorzugsweise mindestens 6 His-Reste). Diese Sequenz hat  
15 stark antigene Eigenschaften und erlaubt somit eine schnelle Überprüfung und leichte Reinigung des rekombinanten Proteins. Monoklonale Antikörper, die das Flag-Peptid binden, sind von der Firma Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division, New Haven,  
20 Connecticut erhältlich. Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können auch in zahlreichen Exons, die durch Introns voneinander getrennt sind, auf dem Strang des Erbinformationsmoleküls abgelegt sein. Damit gehören auch alle denkbaren SPLICE-Varianten (auf mRNA-Ebene) als  
25 Genprodukte zum erfindungsgemäßen Gegenstand. Auch die von diesen verschiedenen SPLICE-Varianten codierten Proteine unterfallen dieser Erfindung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist  
30 ein Antikörper, der ein Epitop auf einem erfindungsgemäßen Genprodukt, insbesondere einem erfindungsgemäßen Protein, erkennt (Anspruch 12). Der Begriff "Antikörper" umfaßt i.S. der vorliegenden Erfindung sowohl polyklonale Antikörper als auch  
35 monoklonale Antikörper (Anspruch 13), chimärische Antikörper, anti-idiotypische Antikörper (gerichtet gegen

erfindungsgemäße Antikörper), die alle in gebundener oder löslicher Form vorliegen und ggf. durch "Label" markiert sein können, sowie auch Fragmente der vorgenannten Antikörper. Neben den Fragmenten von erfindungsgemäßen Antikörpern in Alleinstellung können erfindungsgemäße Antikörper auch in rekombinanter Form als Fusionsproteine mit anderen (Protein)-Bestandteilen auftreten. Fragmente als solche oder Fragmente von erfindungsgemäßen Antikörpern als Bestandteile von Fusionsproteinen werden typischerweise durch die Methoden enzymatischer Spaltung, der Protein-Synthese oder die dem Fachmann geläufigen Rekombinationsmethoden hergestellt.

Bei den polyklonalen Antikörpern handelt es sich um heterogene Mischungen von Antikörpermolekülen, die aus Seren von Tieren hergestellt werden, die mit einem Antigen immunisiert worden sind. Ein monoklonaler Antikörper enthält eine im wesentlichen homogene Population von Antikörpern, die spezifisch gegen Antigene gerichtet sind, wobei die Antikörper im wesentlichen gleiche Epitop-Bindungsstellen aufweisen. Monoklonale Antikörper können durch die im Stand der Technik bekannten Verfahren erhalten werden (z. B. Köhler und Milstein, Nature, 256, 495-397, (1975); US-Patent 4,376,110; Ausübel et al., Harlow und Lane "Antikörper": Laboratory Manual, Cold Spring, Harbor Laboratory (1988)). Die in den vorgenannten Literaturstellen enthaltene Beschreibung wird als Bestandteil der vorliegenden Erfindung in die Offenbarung der vorliegenden Erfindung einbezogen. Erfindungsgemäße Antikörper können einer der folgenden Immunglobulinklassen angehören: IgG, IgM, IgE, IgA, GILD und ggf. einer Unterklasse der vorgenannten Klassen. Ein Hybridom-Zellklon, der erfindungsgemäße monoklonale Antikörper produziert, kann in vitro, in situ oder in vivo kultiviert werden. Die Herstellung von großen Titern an monoklonalen Antikörpern erfolgt vorzugsweise in vivo oder in situ.

Bei den erfindungsgemäßen chimärische Antikörpern handelt es sich um Moleküle, die verschiedene Bestandteile enthalten, wobei diese sich aus verschiedenen Tierarten ableiten (z. B. Antikörper, die eine variable Region, die aus einem Mäuse-monoklonalen Antikörper abgeleitet ist, und eine konstante Region eines humanen Immunglobulin aufweisen). Chimärische Antikörper werden vorzugsweise eingesetzt, um einerseits die Immunogenizität bei der Anwendung zu reduzieren und andererseits die Ausbeuten bei der Produktion zu erhöhen, z.B. ergeben murine monoklonale Antikörper höhere Ausbeuten aus Hybridom-Zelllinien, führen aber auch zu einer höheren Immunogenizität beim Menschen, so daß human/murine chimärische Antikörper vorzugsweise eingesetzt werden.

Chimärische Antikörper und Verfahren zu ihrer Herstellung sind aus dem Stand der Technik bekannt (Cabilly et al., Proc. Natl. Sci. USA 81: 3273-3277 (1984); Morrison et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 81:6851-6855 (1984); Boulianne et al. Nature 312 643-646 (1984); Cabilly et al., EP-A-125023; Neuberger et al., Nature 314: 268-270 (1985); Taniguchi et al., EP-A-171496; Morrison et al., EP-A-173494; Neuberger et al., WO 86/01533; Kudo et al., EP-A-184187; Sahagan et al., J. Immunol. 137: 1066-1074 (1986); Robinson et al., WO 87/02671; Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84:3439-3443 (1987); Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84:214218 (1987); Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988) und Harlow und Lane, Antikörper: A Laboratory Manual, wie oben zitiert. Diese Zitatstellen werden als zur Offenbarung gehörig in die vorliegende Erfindung einbezogen.

Ganz besonders bevorzugt wird ein solcher erfindungsgemäßer Antikörper gegen einen Sequenzabschnitt auf der PYD-Domäne als Epitop gerichtet sein (Anspruch 14).

Ein erfindungsgemäßer anti-idiotypischer Antikörper ist ein Antikörper, der eine Determinante, die im allgemeinen

mit der Antigenbindungsstelle eines erfindungsgemäßen Antikörpers assoziiert ist, erkennt. Ein anti-idiotypischer Antikörper kann durch die Immunisierung eines Tieres der gleichen Art und des gleichen genetischen Typs (z.B. eines Mäusestamms) als Ausgangspunkt für einen monoklonalen Antikörper, gegen welchen ein erfindungsgemäßer anti-idiotypischer Antikörper gerichtet ist, hergestellt werden. Das immunisierte Tier wird die idiotypischen Determinanten des immunisierenden Antikörpers durch die Produktion eines Antikörpers, der gegen die idiotypischen Determinanten gerichtet ist (nämlich ein erfindungsgemäßer anti-idiotischer Antikörper), erkennen (U.S. 4,699,880). Ein erfindungsgemäßer anti-idiotypischer Antikörper kann auch als Immunogen eingesetzt werden, um eine Immunantwort in einem weiteren Tier hervorzurufen und um dort zur Produktion eines sog. anti-anti-idiotypischen Antikörpers zu führen. Der anti-anti-idiotypische Antikörper kann, muß aber nicht, bezüglich seiner Epitop-Konstruktion identisch mit dem originären monoklonalen Antikörper sein, der die anti-idiotypische Reaktion hervorgerufen hat. Auf diese Weise können durch die Verwendung von gegen idiotypische Determinanten eines monoklonalen Antikörpers gerichtete Antikörper andere Klone, die Antikörper von identischer Spezifität exprimieren, identifiziert werden.

Monoklonale Antikörper, die gegen erfindungsgemäße Proteine, Analoge, Fragmente oder Derivate dieser erfindungsgemäßen Proteine gerichtet sind, können eingesetzt werden, um die Bindung von anti-idiotypischen Antikörpern in entsprechenden Tieren, wie z. B. der BALB/c Maus, zu induzieren. Zellen aus der Milz einer solchen immunisierten Maus können verwendet werden, um anti-idiotypische Hybridom-Zelllinien, die anti-idiotypische monoklonale Antikörper sekretieren, zu produzieren. Weiterhin können anti-idiotypische monoklonale Antikörper auch an einen Träger gekoppelt

werden (KLH, "keyhole limpet hemocyanin") und dann verwendet werden, um weitere BALB/c-Mäuse zu immunisieren. Die Sera dieser Mäuse enthalten dann anti-anti-idiotypische Antikörper, die die Bindungseigenschaften der originären monoklonalen Antikörper haben und spezifisch für ein Epitop des erfindungsgemäßen Proteins oder eines Fragments oder Derivats von demselben sind. Die anti-idiotypischen monoklonalen Antikörper haben auf diese Weise ihre eigenen idiotypischen Epitope oder "Idiotope", die strukturell mit dem zu untersuchenden Epitop ähnlich sind.

Die Bezeichnung "Antikörper" soll sowohl intakte Moleküle als auch Fragmente derselben einschließen, z.B. Fab und  $F(ab')_2$ . Fab und  $F(ab')_2$ -Fragmente entbehren eines Fc-Fragments, wie etwa in einem intakten Antikörper vorhanden, so daß sie im Blutkreislauf schneller transportiert werden können und vergleichsweise weniger nicht-spezifische Gewebsbindung als intakte Antikörper aufweisen. Hierbei wird hervorgehoben, daß Fab und  $F(ab')_2$  Fragmente von erfindungsgemäßen Antikörpern bei der Detektion und Quantifizierung von erfindungsgemäßen Proteinen eingesetzt werden können. Solche Fragmente werden typischerweise durch proteolytische Spaltung hergestellt, indem Enzyme, wie z. B. Papain (zur Herstellung von Fab-Fragmenten) oder Pepsin (zur Herstellung von  $F(ab')_2$  Fragmenten) verwendet werden.

Erfindungsgemäße Antikörper, einschließlich der Fragmente von diesen Antikörpern, können zur quantitativen oder qualitativen Detektion von erfindungsgemäßen Protein in einer Probe eingesetzt werden oder auch zur Detektion von Zellen, die erfindungsgemäße Proteine exprimieren und ggf. sekretieren. Die Detektion kann mit Hilfe von Immunofluoreszenz-Verfahren erreicht werden, die Fluoreszenz-markierte Antikörper in Kombination mit

Lichtmikroskopie, Flußzytometrie oder fluorometrischer Detektion durchgeführt werden.

Erfindungsgemäße Antikörper (oder Fragmente dieser Antikörper) eignen sich für histologische Untersuchungen, wie z.B. im Rahmen der Immunofluoreszenz oder Immunoelktromikroskopie, für die in situ Detektion eines erfindungsgemäßen Proteins. Die in situ Detektion kann dadurch erfolgen, daß eine histologische Probe von einem Patienten genommen wird und markierte erfindungsgemäße Antikörper zu einer solchen Probe hinzugegeben werden. Der Antikörper (oder ein Fragment dieses Antikörpers) wird in markierter Form auf die biologische Probe aufgetragen. Auf diese Weise ist es nicht nur möglich, die Anwesenheit von erfindungsgemäßigem Protein in der Probe zu bestimmen, sondern auch die Verteilung des erfindungsgemäßen Proteins in dem untersuchten Gewebe. Bei der biologischen Probe kann es sich um eine biologische Flüssigkeit, ein Gewebeextrakt, geerntete Zellen, wie z. B. Immunzellen oder Herzmuskel- oder Leberzellen, oder allgemein um Zellen, die in einer Gewebekultur inkubiert worden sind, handeln. Die Detektion des markierten Antikörpers kann je nach Art der Markierung durch im Stand der Technik bekannte Verfahren (z. B. durch Fluoreszenzverfahren) erfolgen. Die biologische Probe kann aber auch auf einem Festphasenträger, wie z. B. Nitrocellulose oder ein anderes Trägermaterial, aufgetragen werden, so daß die Zellen, Zellteile oder löslichen Proteine immobilisiert werden. Der Träger kann dann mit einem geeigneten Puffer ein- oder mehrfach gewaschen werden, wobei nachfolgend mit einem detektierbar markierten Antikörper nach der vorliegenden Erfindung behandelt wird. Der Festphasenträger kann dann mit dem Puffer ein zweites Mal gewaschen werden, um nicht-gebundenen Antikörper zu beseitigen. Die Menge an gebundener Markierung auf dem Festphasenträger kann dann mit einem herkömmlichen Verfahren bestimmt werden.



Als Träger eignen sich insbesondere Glas, Polystyrol, Polypropylen, Polyethylen, Dextran, Nylon-Amylasen, natürliche oder modifizierte Zellulosen, Polyacrylamide und Magnetit. Der Träger kann entweder bedingt löslichen oder unlöslichen Charakters sein, um die Bedingungen nach Maßgabe der vorliegenden Erfindung zu erfüllen. Das Trägermaterial kann beliebige Formen einnehmen, z. B. in Form von Kügelchen ("beads"), oder zylindrisch oder sphärisch sein, wobei Polystyrol-Kügelchen als Träger bevorzugt sind.

Eine detektierbare Antikörpermarkierung kann auf verschiedene Weise erfolgen. Beispielsweise kann der Antikörper an ein Enzym gebunden werden, wobei das Enzym schließlich in einem Immunoassay (EIA) eingesetzt werden kann. Das Enzym kann dann später mit einem entsprechenden Substrat reagieren, so daß eine chemische Verbindung entsteht, die auf eine dem Fachmann geläufige Art und Weise detektiert und ggf. quantifiziert werden kann, z. B. durch Spektrophotometrie, Fluorometrie oder andere optische Verfahren. Bei dem Enzym kann es sich um Malat-Dehydrogenase, Staphylokokken-Nuklease, delta-5-Steroid Isomerase, Hefe-alkohol-Dehydrogenase, alpha-Glycerophosphat-dehydrogenase, Triosephosphatisomerase, Meerrettich-Peroxidase, alkalische Phosphatase, Aspariginase, Glucoseoxidase, beta-Galactosidase, Ribonuklease, Urease, Katalase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Glucoamylase oder Acetylcholinesterase handeln. Die Detektion wird dann über ein chromogenes Substrat, das spezifisch für das für die Markierung eingesetzte Enzym ist, ermöglicht und kann schließlich z.B. über Sichtvergleich des durch die Enzymreaktion umgesetzten Substrats im Vergleich zu Kontrollstandards erfolgen.

Weiterhin kann die Detektion durch andere Immunoassays sichergestellt werden, z.B. durch radioaktive Markierung der Antikörper oder Antikörperfragmente (also durch einen

Radioimmunoassay (RIA; Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, Work, T. et al. North Holland Publishing Company, New York (1978). Das radioaktive Isotop kann dabei durch die Verwendung von  
5 Szintillationszählern oder durch Autoradiographie detektiert und quantifiziert werden.

Fluoreszierende Verbindungen können gleichfalls zur Markierung eingesetzt werden, beispielsweise Verbindungen wie Fluoresceinisothiocyanat, Rhodamin, Phycoerythrin,  
10 Phycocyanin, Allophycocyanin, o-Phthaldehyd und Fluorescamin. Auch fluoreszenzemittierende Metalle, wie z. B.  $^{152}\text{E}$  oder andere Metalle aus der Lanthanid-Gruppe, können eingesetzt werden. Diese Metalle werden an den Antikörper über Chelatgruppen, wie z. B.  
15 Diethylentriaminpentaessigsäure (ETPA) oder EDTA angekoppelt. Weiterhin kann der erfindungsgemäße Antikörper über eine mit Hilfe von Chemilumineszenz wirkende Verbindung angekoppelt werden. Die Gegenwart des Chemilumineszenz-markierten Antikörpers wird dann über  
20 die Lumineszenz, die im Verlauf einer chemischen Reaktion entsteht, detektiert. Beispiele für derartige Verbindungen sind Luminol, Isoluminol, Acridiniumester, Imidazol, Acridiniumsalz oder Oxalatester. Gleichermaßen können auch biolumineszente Verbindungen zum Einsatz  
25 kommen. Biolumineszenz ist eine Unterart der Chemilumineszenz, die bei biologischen Systemen vorgefunden wird, wobei ein katalytisches Protein die Effizienz der chemilumineszenten Reaktion verstärkt. Die Detektion des biolumineszenten Proteins erfolgt wiederum  
30 über die Lumineszenz, wobei als biolumineszente Verbindung beispielsweise Luciferin, Luciferase oder Aequorin in Betracht kommen.

Ein erfindungsgemäßer Antikörper kann für die Verwendung in einem immunometrischen Assay, auch bekannt als "two-  
35 site" oder "sandwich" Assay, zur Anwendung gelangen. Typische immunometrische Assay-Systeme schließen sog.

"Vorwärts"-Assays ein, die sich dadurch auszeichnen, daß erfindungsgemäße Antikörper an ein Festphasensystem gebunden sind und daß der Antikörper mit der Probe, die untersucht wird, auf diese Weise in Kontakt gebracht wird. Derart wird das Antigen aus der Probe durch die Bildung eines binären Festphasen-Antikörper-Antigen-Komplexes aus der Probe isoliert. Nach einer geeigneten Inkubationszeit wird der feste Träger gewaschen, um den verbleibenden Rest der flüssigen Probe zu beseitigen, einschließlich des ggf. nicht gebundenen Antigens, und daraufhin mit einer Lösung in Kontakt gebracht, die eine unbekannte Menge an markiertem Detektionsantikörper enthält. Der markierte Antikörper dient hierbei als sog. Reporter-Molekül. Nach einer zweiten Inkubationszeit, die es den markierten Antikörper erlaubt, mit dem an die Festphase gebundenen Antigen zu assoziieren, wird der Festphasenträger erneut gewaschen, um markierte Antikörper, die nicht reagiert haben, zu beseitigen.

In einer alternativen Assay-Form kann auch ein sog. "sandwich"-Assay zum Einsatz kommen. Hierbei kann ein einziger Inkubationsschritt ausreichen, wenn der an die Festphase gebundene Antikörper und der markierte Antikörper beide gleichzeitig auf die zu testende Probe aufgebracht werden. Nach Abschluß der Inkubation wird der Festphasenträger gewaschen, um Rückstände der flüssigen Probe und der nicht-assoziierten markierten Antikörper zu beseitigen. Die Anwesenheit von markiertem Antikörper auf dem Festphasenträger wird genau so bestimmt, wie bei den konventionellen "Vorwärts"-Sandwich-Assay. Bei dem sog. reversen Assay wird schrittweise zunächst eine Lösung des markierten Antikörpers zur Flüssigprobe hinzugefügt, gefolgt von der Beimischung von nicht-markiertem Antikörper, gebunden an einen Festphasenträger, nach Ablauf einer geeigneten Inkubationszeit. Nach einem zweiten Inkubationsschritt wird der Festphasenträger in herkömmlicher Weise gewaschen, um ihn von Probenüberresten und von markiertem Antikörper, der nicht

reagiert hat, zu befreien. Die Bestimmung des markierten Antikörpers, der mit dem Festphasenträger reagiert hat, wird dann, so wie oben beschrieben, durchgeführt.

5 Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung von Genprodukten mit mindestens einer PYD-Domäne, wobei die Wirtszellen mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transformiert und dann  
10 unter geeigneten, die Expression fördernden Bedingungen kultiviert werden, so daß das Genprodukt schließlich aus der Kultur aufgereinigt werden kann (Anspruch 15). Das Protein der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz kann dabei, abhängig von dem Expressionssystem, aus einem Kulturmedium oder aus Zellextrakten isoliert werden. Der Fachmann kann  
15 ohne weiteres erkennen, daß die jeweiligen Isolierungsmethoden und das Verfahren bei der Aufreinigung des von einer erfindungsgemäßen DNA codierten, rekombinanten Proteins stark vom Typ der Wirtszelle oder auch von dem Umstand, ob das Protein in das Medium  
20 sekretiert wird, abhängt. Zum Beispiel können Expressionssysteme eingesetzt werden, die zur Sekretion des rekombinanten Proteins führen. Das Kulturmedium muß in diesem Fall durch kommerziell erhältliche Proteinkonzentrationsfilter, z.B. Amicon oder Millipore Pelicon, aufkonzentriert werden. Nach dem  
25 Konzentrationsschritt kann ein Reinigungsschritt erfolgen, z.B. ein Gelfiltrationsschritt. Alternativ kann aber auch ein Anionenaustauscher eingesetzt werden, der eine Matrix mit DEAE aufweist.

30 Als Matrix dienen dabei alle aus der Proteinreinigung bekannten Materialien, z.B. Acrylamid oder Agarose oder Dextran oder ähnliches. Es kann aber auch ein Kationenaustauscher eingesetzt werden, der dann typischerweise  
35 Carboxymethyl-Gruppen enthält. Zur weiteren Reinigung eines durch eine erfindungsgemäße DNA codierten Proteins

können dann HPLC-Schritte dienen. Es kann sich um einen oder mehrere Schritte handeln. Insbesondere wird die "Reversed- Phase"-Methode eingesetzt. Diese Schritte dienen zum Erhalt eines im wesentlichen homogenen rekombinanten Proteins einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz.

Neben bakteriellen Zellkulturen zur Isolierung des Genprodukts können auch transformierte Hefezellen eingesetzt werden. In diesem Fall kann das translatierte Protein sekretiert werden, so daß die Proteinreinigung vereinfacht wird. Sekretiertes rekombinantes Protein aus einer Hefewirtszelle kann durch Methoden erhalten werden, wie sie bei Urdal et al. (J. Chromato. 296:171 (1994)) offenbart sind.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Expression von Genprodukten mit mindestens einer PYD-Domäne, wobei Wirtszellen mit einem Expressionsvektor, der eine erfindungsgemäße DNA-Sequenz enthält, transformiert werden (Anspruch 17). Dieses Verfahren zur Expression von Genprodukten, die auf einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz beruhen, dient nicht dazu, das entsprechende Genprodukt zu konzentrieren und aufzureinigen, sondern vielmehr dazu, den Zellstoffwechsel durch das Einführen der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen über die Expression des dazugehörigen Genprodukts zu beeinflussen. Hier ist insbesondere an die Verwendung der mit Hilfe von Expressionsvektoren transformierten Wirtszellen zum Zwecke der Ausschaltung der inflammatorischen Reaktion zu denken. Durch die Verwendung eines sogenannten konstitutiven Promotors können in diesen Zellen gleichbleibende Konzentrationen von auf erfindungsgemäßen Sequenzen beruhenden Proteinen exprimiert werden. Auf diese Weise wird dauerhaft die Auslösung der Inflammation unterbunden.

Die entsprechenden Zelllinien werden dadurch gegenüber einer Vielzahl von inflammatorischen Stimulanzen resistent. Diese modifizierten Zellen können auch  
5 gegebenenfalls wieder in den Säuger- oder humanen Organismus rücküberführt werden. Auf diese Weise wird durch in vitro mit den erfindungsgemäßen Expressionsvektoren manipulierter Zellen und die anschließende Übertragung (Transplantation) in den  
10 Organismus ein gentherapeutischer Einsatz der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen möglich. Dabei werden Expressionsvektoren mit den erfindungsgemäßen Sequenzen vorzugsweise in solche Zellen transfiziert, die im Organismus einer Fehlsteuerung der Inflammation  
15 anheimfallen (bspw. Hepatocyten bei chronischer Leberentzündung). Insbesondere werden in einem solchen gentherapeutischen Ansatz erfindungsgemäße Sequenzen eingesetzt, die das inflammatorische Signal blockieren, bspw. Fragmente, die das inflammatorische Signal nicht  
20 weitertragen und damit die Signaltransduktion unterbrechen.

Mit dem vorliegenden Erfindungsgedanken geht aber auch ein gentherapeutisches Verfahren, das in vivo durchgeführt  
25 werden kann, einher. Zu diesem Zwecke werden Vektoren eingesetzt (z.B. Liposomen, Adenoviren, Retroviren oder ähnliche oder auch nackte DNA), die die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen gezielt in die gewünschten Zielzellen des Organismus insertieren. Bei den Zielzellen handelt es sich  
30 typischerweise um Zellen, deren Inflamationsregulation gestört ist, insbesondere um Zellen, die pathologisch eine verstärkte Disposition zur Entzündungsreaktion zeigen (bspw. bei chronischer Leberentzündung). In diesem Zusammenhang können Fragmente einer erfindungsgemäßen DNA-  
35 Sequenz zum Einsatz kommen, die inhibitorische Wirkung entfalten, bspw. DNA-Sequenzen, die im wesentlichen nur

die PYD-Domäne enthalten und damit nur noch eine Assziierungsfunktion wahrnehmen können, nicht aber weitergehend biologische Signale (zur Inflammation) weitergeben können - also keine weitere biologische Funktionalität aufweisen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz (Allele, Derivate, Fragmente) oder eines erfindungsgemäßen Genprodukts zur Behandlung von Erkrankungen, die auf fehlgesteuerter intrazellulärer Signaltransduktion beruhen (Anspruch 17). Die vorgenannte erfindungsgemäße Verwendung von DNA-Sequenzen schließt auch die Verwendung von oben beschriebenen erfindungsgemäßen Expressionsvektoren ein, die eine erfindungsgemäße Nukleotidsequenz, bspw. eine in Fig. 1 offenbarte Nukleotidsequenz oder ein funktionelles Derivat oder Allel einer solchen Sequenz (oder auch ein infunktionelles Derivat einer solchen Sequenz) aufweisen, mit dem Ziel, die fehlgeleitete intrazelluläre Signaltransduktion zu korrigieren. Die Verwendung kann nach gentherapeutischen Verfahren über Injektion von nackter erfindungsgemäßer DNA oder dem Protein oder über Genfähren, insbesondere virale oder liposomale Vektoren, erfolgen. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher sowohl die Verwendung derartiger erfindungsgemäßer Expressionsvektoren sowie die erfindungsgemäße Verwendung von Zellen (d.h. die Verwendung zur Auslösung (oder zur Blockade) des Inflammationsgeschehens), die mit erfindungsgemäßen Expressionsvektoren transfiziert sind.

Im einzelnen läßt sich feststellen, daß derartige Gentherapieansätze sich bereits als wirksam bei der Therapie von genetisch bedingten Erkrankung, beispielsweise bei der Bluterkrankheit, und auch bei der Behandlung anderer genetischer Erkrankung, wie

beispielsweise cystischer Fibrose, sich als wirksam erwiesen haben. In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Nukleotidsequenz erfindungsgemäßer Art, beispielsweise eine Nukleotidsequenz gemäß den in Figur 1

5 enthaltenen Nukleotidsequenzen oder eine Variante (Derivat, Fragment (vor allem mindestens 100 Basen umfassen, oder Allel) dieser Sequenz in einen geeigneten Vektor überführt, der die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz in die Säugetierzellen, vorzugsweise

10 Humanzellen, einschleust. Besonders geeignete Transfektionsvektoren für diese Anwendung sind Retroviren und Adenoviren. Alternativ können auch erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen in einem molekularen Konjugat mit einem Virus (beispielsweise einem Adenovirus) oder mit

15 viralen Komponenten (beispielsweise Capsidproteinen) komplexiert sein. Geeignete Methoden für die Bildung derartiger Vektoren sind im Stand der Technik wohl bekannt, wobei beispielsweise auf die Offenbarung in "Working toward Human Genetherapy", Kapitel 28 ( in

20 Recombinant DNA, Second Edition, Watson GD et al, New York: Scientific American Books, S. 567 - 581, 1992) verwiesen wird. Bei einem derartigen gentherapeutischen Verfahren werden mit erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen transfizierte Vektoren in Zellen oder Geweben

25 vorzugsweise durch Injektion, Inhalation, orale Einnahme oder Aufnahme durch Schleimhäute dem betroffenen Patienten verabreicht. Ein derartiger Versuchsansatz wird im allgemeinen als in-vitro-Gentherapie bezeichnet. Alternativ können Zellen oder Gewebe, beispielsweise

30 hämatopoietische (Stamm)zellen aus dem Knochenmark oder andere adulte Stammzellen (vor allem Gewebespezifische Stammzellen), dem betroffenen Patienten entnommen werden und nach Maßgabe der im Stand der Technik bekannten Verfahren in-vitro kultiviert werden. Die entsprechend

35 ausgestalteten Vektoren mit den erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen werden dann in-vitro den Zellen oder



Gewebe zugegeben, wobei vorzugsweise die Inkorporation derartiger Vektoren in die Zellen durch Elektroporation erfolgt. Die derart modifizierten Zellen oder Gewebe werden schließlich dem betroffenen Patienten  
5 reimplantiert. Derartige gentherapeutische Verfahren werden als ex-vivo-Gentherapie bezeichnet. Für beide gentherapeutische Ansätze, also in-vivo- oder ex-vivo-Verfahren, können erfindungsgemäße Nukleotidsequenzen operativ mit einer regulatorischen DNA-Sequenz verbunden  
10 werden, wobei es sich auch um eine heterologe regulatorische DNA-Sequenz handeln kann, so daß ein rekombinantes Konstrukt in der transfizierten Zelle vorliegt. Dieses Konstrukt kann dann in den Vektor insertiert werden und schließlich direkt dem betroffenen  
15 Patienten in einem in-vivo-Gentherapieansatz bzw. den Zellen oder Geweben des betroffenen Patienten in einem ex-vivo-Gentherapieansatz zugeführt werden. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann das genetische Konstrukt in die Zellen oder die Gewebe des Tieres,  
20 entweder in-vivo- oder ex-vivo in einem molekularen Konjugat mit einem Virus, (beispielsweise einem Adenovirus oder viralen Komponenten (beispielsweise viralen Capsid-Proteinen) zugeführt werden. Die oben beschriebenen gentherapeutischen Ansätze können entweder  
25 (a) zu einer homologen Rekombination zwischen der Nukleotidsequenz und dem infunktionellen Gen in den Zellen des betroffenen Tieres oder (b) zu einer zufälligen Insertion des Gens an einer beliebigen Stelle im Wirtszellgenom oder (c) zur Inkorporation des Gens in  
30 den Zellkern führen, wobei es dann als extrachromosomales genetisches Element vorliegen kann. Die Offenbarung derartiger Verfahren und Ansätze zur Gentherapie können dem US-Patent US 5,578,461, der WO 94/12650 und der WO 93/09222 entnommen werden, die  
35 Bestandteil der Offenbarung der vorliegenden Anmeldung sind. Die transfizierten Wirtszellen, die homolog oder

heterolog sein können, können mit einer semipermeablen Schicht eingehüllt werden und derart in die betroffenen Patienten reimplantiert werden, wobei auf diese Weise ein Angriff des Immunsystems des Patienten auf die reimplantierten Zellen verhindert wird (siehe WO 93/09222).

Bevorzugt ist dabei die Verwendung einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz oder eines erfindungsgemäßen Genprodukts, wenn es sich bei der Erkrankung um eine solche mit einer überschießenden Entzündungsreaktion handelt (Anspruch 18). Ganz besonders bevorzugt ist die Verwendung einer solchen DNA-Sequenz oder eines solchen Genprodukts zur Behandlung (zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung) von Psoriasis, Arteriosklerose, bakteriellen oder viralen Infektionserkrankungen, insbesondere bakterieller oder viraler Meningitis oder bakterieller Pneumonie, multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis, Asthma, Sarkoidose, glomerulärer Nephritis oder Osteoarthritis (Anspruch 19). Dies kann bspw. durch Fragmente erreicht werden, die die Signaltransduktion blockieren, bspw. um Sequenzen, die nur für die PYD-Domäne (oder Teile hiervon) codieren bzw. nur diese enthalten.

Gemäß einem weiteren Gegenstand der vorliegenden Erfindung wird eine Verbindung zur Verfügung gestellt, die dadurch gekennzeichnet, daß sie die Funktion der erfindungsgemäßen Genprodukte (Proteine) als intrazelluläres Signalmolekül einer inflammatorischen Signalkaskade zur Auslösung von Entzündungsreaktionen inhibiert. Insbesondere blockieren erfindungsgemäße Verbindungen die spezifische Interaktion von PYD-Domänen zur intrazellulären Signalweiterleitung (Anspruch 20). Bevorzugt handelt es sich bei einer erfindungsgemäßen chemischen Verbindung, die die erfindungsgemäße PYD-Funktion (bspw. bei Inflammation oder Apoptose)

blockiert, um ein Oligopeptid, das chemisch modifiziert (bspw. zur erleichterten Passage durch die Zellmembran, insbesondere durch endständige (vor allem N-terminale) Sequenzbereiche) sein kann oder nicht-modifiziert sein  
5 kann. Insbesondere kann es sich um einen an der PYD-Assoziierung beteiligten nativen Sequenzbereich eines erfindungsgemäßen Proteins handeln. Zu nennen wären bspw. sog. DN-Varianten (bspw. die AS 1 bis 94 von humanem Pycard oder entsprechende PYD-Domänen von NALP-Proteinen  
10 (s. Figur 1)), die bspw. auch die nachfolgend beschriebenen gentherapeutischen Verfahren verabreicht werden können. Derartige DN-Varianten können auch ausschließlich die NAD-Domäne oder einen Teil derselben oder eine die LRR-Domäne oder einen Teil derselben oder  
15 eine CARD-Domäne oder einen Teil derselben enthalten und auf diese Weise dominant negativ die Signalkaskade, insbesondere inflammatorische Signalkaskaden blockieren. Weiter unten sind die medizinischen Indikationen für Verwendung (Arzneimittelherstellung) derartiger DN-Varianten nativer  
20 erfindungsgemäßer Sequenzen offenbart. Erfindungsgemäß werden somit Sequenzen einzelner Domänen (LRR, PYD, CARD, NAD) erfindungsgemäßer Sequenzen offenbart.

Damit kann bspw. ein erfindungsgemäße inhibitorisches Molekül, vorzugsweise ein Tetra- bis Dodekamer, eine dem  
25 nativen Substrat entsprechende Aminosäuresequenz enthalten oder aus einer nativen Substratsequenz bestehen, wobei das vorzugsweise Tetra- bis Dodekamer typischerweise auch einen Sequenzabschnitt aus einer PYD-Domäne eines erfindungsgemäßen Proteins aufweist. Ggf.  
30 kann ein derartiges Oligopeptid auch dadurch chemisch modifiziert sein, daß die amidartige Bindung zwischen den einzelnen Aminosäuren durch eine gegen proteolytischen Abbau resistente alternative chemische Gruppe (bspw. Schwefel- oder Phosphorbrücken) ersetzt wird.

35 Eine erfindungsgemäße chemische Verbindung ist vorzugsweise eine organisch-chemische Verbindung mit

einem Molekulargewicht von <5000, insbesondere <3000, vor allem <1500 und ist typischerweise physiologisch gut verträglich (Anspruch 21). Ggf. wird sie Bestandteil einer Zusammensetzung mit mindestens einem weiteren  
5 Wirkstoff sowie vorzugsweise Hilfs- und/oder Zusatzstoffen sein und als Arzneimittel eingesetzt werden können. Besonders bevorzugt wird das organische Molekül dann sein, wenn die Bindungskonstante für die Bindung an ein erfindungsgemäßes Protein, insbesondere an die  
10 Domäne PYD eines erfindungsgemäßen Proteins, mindestens  $10^7 \text{ mol}^{-1}$  beträgt. Die erfindungsgemäße Verbindung wird vorzugsweise so beschaffen sein, daß sie die Zellmembran passieren kann, sei es durch Diffusion oder über (intra)membranöse Transportproteine (Anspruch 22).

15

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die erfindungsgemäße Verbindung ein Antikörper, vorzugsweise ein gegen die PYD-Domäne eines erfindungsgemäßen Proteins gerichteter  
20 Antikörper, der ex vivo in retransplantierte Wirtszellen oder durch gentherapeutische in vivo Verfahren in Wirtszellen eingeschleust wird und dort als "intrabody" nicht sekretiert wird, sondern intrazellulär seine Wirkung entfalten kann. Durch derartige erfindungsgemäße  
25 "Intrabodies" sind die Zellen vor einer inflammatorischen Reaktion geschützt. Eine derartige Vorgehensweise wird typischerweise für Zellen jener Gewebe in Betracht kommen, die beim Patienten eine pathophysiologisch übersteigertes inflammatorisches Verhalten zeigen, also  
30 bspw. bei Hepatocyten (Leberentzündung), Keratinozyten, Bindegewebszellen, Immunzellen oder Muskelzellen. Entsprechend sind auch derartig mit erfindungsgemäßen "Intrabodies" gentherapeutisch modifizierte Zellen Bestandteil der vorliegenden Erfindung.

35

Im einzelnen eignen sich erfindungsgemäße Antikörper gegen erfindungsgemäße Aminosäuresequenzen, insbesondere

erfindungsgemäße Antikörper, die gegen eine PYD-Domäne gerichtete sind, dann besonders, wenn sie beispielsweise als "single-chainFv" (scFv) oder Fab-Fragmente vorliegen und zur Erkennung der Zielstruktur (bspw. der PYD-Domäne) in verschiedene subzelluläre Kompartimente geleitet werden können, um dort die Aktivität des Zielmoleküls entweder direkt oder indirekt durch Interferenz mit den subzellulären Transportwegen zu blockieren. Beispielsweise kann für eine zielgerichtete subzelluläre Positionierung des Intrabodies ein ER-Retensionssignal (KDEL) an den C-Terminus des Antikörperfragments mit einer sogenannten "Leader-Sequenz" angehängt werden, was zu einer Retention im Lumen des endoplasmatischen Retikulums führt. Durch eine entsprechende mitochondriale Leadersequenz, beispielsweise der Cytochrom C-Oxidaseeinheit VIII, kann ein Transport in die Mitochondrien erreicht werden. Die cytoplasmatische Expression des Antikörpers wird dadurch sichergestellt, daß die Expression der Antikörperfragmente ohne irgendeine Signal- oder Leader-Sequenz erfolgt. Auch ein Transport in den Nukleus ist möglich, indem zum Beispiel vom großen SV 40 T-Antigen eine nukleäre Lokalisationssequenz gewählt wird (PKKKRKV), und zwar entweder am N- oder C-Terminus. Entsprechende technische Maßnahmen müssen eingesetzt werden, um die Expression im reduzierenden Milieu des Cytoplasmas unter Ausbildung von Disulfid-Brücken sicherstellen zu können. Die nachfolgenden Veröffentlichungen aus dem Stand der Technik werden inhaltlich explizit in die vorliegende Offenbarung miteinbezogen (Marasco, 1997, Gene Therapy. 4, 11-15; Richardson, & Marasco, 1995, Trends Biotechnology 13, 306 - 310; Biocca und Cattaneo 1995, Trends Cell Biology 5, 248 - 252; Biocca et al, 1995, Bio/Techn. 13, 1110-1115, Biocca et al, 1990, EMBO Journal 9, 101 - 108; Piche et al, 1998, Cancer Research 58, 2134 - 2140; Rosso et al, 1996, Biochem. Biophys. Res. Communication 220, 255 bis 263).

Als weitere bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen (bspw. zur Inhibition von molekularen Mechanismen, die für überschießende Entzündungsereignisse ursächlich sind) kommen auch Sequenzen (DNA oder RNA) in Betracht, die im Zusammenhang mit anti-sense Technologien stehen. In diesem Fall werden antisense DNA oder RNA in Zellen eingeschleust (bspw. durch gentherapeutische Ansätze, bspw. Verwendung rekombinanter Viren, s.o.) und diese können auf diese Weise durch komplementäre Bindung transkribierter mRNA (für erfindungsgemäße PYD-Domänen enthaltende Proteine) die Translation der dazu gehörigen polymorphen genomischen Sequenz blockieren. Eine derartige Vorgehensweise ist insbesondere bei Patienten deren Expressionsniveaux von PYD-Domänen enthaltenden Proteinen pathologisch erhöht ist, relevant.

Weitere Verbindungen bzw. Therapieverfahren zur Behandlung der offenbarten medizinischen Indikationen (bzw. zur Herstellung eines Arzneimittels) beruhen auf Ribozym-Methoden. Hierzu werden Ribozyme verwendet, die eine Ziel-mRNA schneiden können. Im vorliegenden Fall werden daher Ribozyme offenbart, die native mRNA von erfindungsgemäßen Proteinen (bspw. NALP1 oder anderen PYD-Domänen enthaltenden Proteinen) spalten können. Erfindungsgemäße Ribozyme müssen dabei mit der erfindungsgemäßen Ziel-mRNA interagieren können, bspw. über Basenpaarung, und anschließend die mRNA spalten, um die Translation von bspw. NALP1 oder Pycard zu blockieren. Die erfindungsgemäßen Ribozyme werden über geeignete Vektoren in die Zielzellen geschleust (insbesondere Plasmide, modifizierte Tierviren, insbesondere Retroviren), wobei die Vektoren neben ggf. anderen Sequenzen eine cDNA -Sequenz für ein erfindungsgemäßes Ribozym aufweist.

Eine erfindungsgemäße chemische Verbindung mit der Funktion der Blockade der bspw. inflammatorischen

Funktion von erfindungsgemäßen physiologischen Proteinen (s. Fig. 1) kann als Arzneimittel Verwendung finden. Insbesondere ist eine erfindungsgemäße chemische Verbindung (zur Herstellung eines Arzneimittels) zur  
5 Behandlung von Erkrankungen, für die zumindest tw. eine pathologische hyperinflammatorische Reaktion kausal oder symptomatisch ist, geeignet. Damit kann ein erfindungsgemäßer Inhibitor der zellulären Funktion eines erfindungsgemäßen Proteins, also bspw. der  
10 inflammatorischen Reaktion, insbesondere ein Inhibitor der Assoziierung von PYD-Domänen, zur Inflammationsinhibition ganz besonders bei der Behandlung der folgenden Erkrankungen bzw. zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung der folgenden Erkrankungen  
15 eingesetzt werden: Autoimmunerkrankungen, Psoriasis, Arteriosklerose, bakterielle oder virale Infektionserkrankungen, insbesondere bakterielle oder virale Meningitis oder bakterielle Pneumonie, multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Asthma, Sarkoidose,  
20 glomeruläre Nephritis oder Osteoarthritis, Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson (Anspruch 23).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verfahren ("Screening-Methoden") zur Identifizierung von Verbindungen (organisch-chemischen Verbindungen,  
25 Biomoleküle (bspw. Oligonukleotide, Antikörper oder Antikörperfragmente, Oligopeptide, Ribozyme, DN-Mutanten von erfindungsgemäßen Proteinen) mit inhibitorischen Eigenschaften in Hinblick auf die Auslösung oder Weiterleitung von Signalen, die mit inflammatorischen  
30 Reaktionen in Zusammenhang stehen, insbesondere von Verbindungen die die Interaktion von Proteinen der inflammatorischen Signalkaskade, insbesondere von physiologisch miteinander reagierenden PYD-Domänen (gleicher oder verschiedener Proteine) blockieren (bspw.  
35 die Assoziierung des Inflammosoms blockieren, indem bspw. die Assoziierung von NALP1 und Pycard inhibiert wird).

Andere erfindungsgemäße Angriffspunkte der Interaktion sind bspw. die Inhibition der Interaktion zwischen der CARD-Domäne von Caspase-1 und der CARD-Domäne von Pycard oder die Inhibition der Interaktion der CARD-Domäne von  
5 Caspase-5 und NALP1. Schließlich kann es auch bevorzugt sein, dass erfindungsgemäße Verbindungen die Wechselwirkung der LRR-Domäne von Proteinen der NALP-Klasse, bspw. NALP1, mit weiter stromaufwärts liegenden Proteinen oder Stimuli, modulieren (blockieren oder  
10 aktivieren). Ggf. können auch Verbindungen, die als Aktivatoren der vorgenannten Interaktionen wirken, bevorzugt sein.

Erfindungsgemäße Verfahren sehen vor, daß (a) Zellen, vor allem Hepatocyten, insbesondere T-Lymphocyten, so  
15 modifiziert werden, daß sie eine inflammatorische Reaktion zeigen, (b) diese gemäß (a) modifizierten Zellen in einer Zellkultur bereitgestellt werden, (c) Testsubstanzen zur Zellkultur zugegeben werden, (d) die das Ausmaß der inflammatorischen Reaktion der Zellen in  
20 der Zellkultur bestimmt wird. Hierzu werden nach dem erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise mehrere parallele Versuche mit ansteigenden Konzentrationen der Testsubstanz angesetzt, um im Falle einer die Inflammation inhibierenden Wirkung der Testsubstanz deren  
25 ID<sub>50</sub>-Wert bestimmen zu können.

Alternativ kann ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Identifizierung der vorgenannten Verbindungen auch die folgenden Schritte umfassen: (a) ein in vitro Testsystem bereitgestellt wird, das mindestens eine erfindungsgemäße  
30 DNA-Sequenz enthält, (b) in Form eines Hochdurchsatz-"Screenings" potentielle Wirkstoffsubstanzen dem gemäß (a) bereitgestellten in vitro Testsystem zugeführt werden, und (c) ein physikalisches, chemisches oder biologisches Signal in dem Testsystem zur Identifikation von  
35 Wirkstoffsubstanzen detektiert wird. Chemische Bibliotheken können durchsucht werden, und zwar sowohl



nach aktivierenden oder inhibierenden Substanzen. In diesem Zusammenhang wird auf die Offenbarung des Lehrbuchs von Böhm, Klebe und Kubinyi (Wirkstoffdesign, 1996, Spektrum-Verlag, Heidelberg) verwiesen, auf das  
5 diesbezüglich vollinhaltlich Bezug genommen wird. Insbesondere können Verbindungen, die einem der vorgenannten erfindungsgemäßen Verfahren identifiziert werden, auch geeignet sein, das Expressionsniveau des nativer erfindungsgemäßer Sequenzen, bspw. von Pycard  
10 oder NALP1, beeinflussen. Der Wirkungsmechanismus kann auf einer Beeinflussung bspw. der Aktivität des nativen Promotors beruhen, so dass die Transkriptionsaktivität moduliert wird.

Ein erfindungsgemäßes "Screening"-Verfahren kann auch mit  
15 Hilfe von sogenannten "Proteomics"-Techniken durchgeführt werden. Hierzu werden zur Bestimmung eines Standards typische Unterschiede im Expressionsmuster von Zellen mit inflammatorischer Reaktion und Kontrollzellen experimentell erhoben. Methodisch wird für ein derartiges  
20 Verfahren typischerweise die 2D-Gelelektrophorese eingesetzt. Testsubstanzen, die das Expressionsmuster erfindungsgemäßer Substanzen verändern, können dann auf Grund der veränderten Expressionsmuster erkannt werden (s. auch die Offenbarung bei Rehm, H., Der  
25 Experimentator, Spektrum-Verlag, 2000)

Über Strukturanalysen eines erfindungsgemäßen Proteins lassen sich gezielt außerdem erfindungsgemäße Verbindungen finden, die eine spezifische  
30 Bindungsaffinität aufweisen (Rationales Drug Design (Böhm, Klebe, Kubinyi, 1996, Wirkstoffdesign, Spektrum-Verlag, Heidelberg)). Hier wird die Struktur oder eine Teilstruktur, Derivat, Allel, Isoform oder ein Teil einer solchen von einem der erfindungsgemäßen Proteine über  
35 NMR- oder Röntgenkristallographie-Verfahren (nach entsprechender Kristallisierung, z.B. nach der Methode des „hängenden Tropfens“) ermittelt oder, sofern eine

solche hochaufgelöste Struktur nicht vorliegt, mit Hilfe von Strukturvorhersage-Algorithmen ein Strukturmodell eines erfindungsgemäßen Proteins, bspw. auch mit Hilfe von homologen bereits strukturell aufgeklärten Proteinen (z.B. von Rhodopsin), erstellt, und diese(s) benutzt, um mit Unterstützung von Molecular Modelling Programmen Verbindungen, die als Agonisten oder Antagonisten wirken können, zu identifizieren, für die sich eine hohe Affinität zum erfindungsgemäßen Protein vorhersagen läßt. Ggf. lassen sich die oben bezeichneten Verfahren zur Strukturaufklärung auch miteinander kombinieren. Geeignete Kraftfelder werden zur Simulation der Affinität einer potentiell affinen Verbindung an eine interessante Substruktur eines erfindungsgemäßen Proteins, bspw. das aktive Zentrum, eine Bindungstasche oder eine „hinge“-Region, eingesetzt. Diese Substanzen werden dann synthetisiert und in geeigneten Testverfahren auf ihr Bindungsvermögen und ihre therapeutische Nutzbarkeit getestet. Derartige in silico Verfahren zur Identifizierung potentieller Wirkstoffe, die ihre Wirkung durch Bindung an erfindungsgemäße PYD-Domänen-Proteine entfalten, sind gleichfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Ferner werden auch, insbesondere in-vitro Verfahren offenbart, die es erlauben, nativ auftretende Polymorphismen der erfindungsgemäßen Proteine zu identifizieren. Für derartige Verwendungszwecke eignen sich insbesondere PCR-Methoden, insbesondere auch RT-PCR-Verfahren, also die Diagnose auf der Basis von mRNA, die in vitro entsprechend in cDNA übersetzt wird und dann mit Hilfe von herkömmlichen PCR-Verfahren vervielfältigt wird. Auch entsprechende Array-Techniken, die erfindungsgemäße Oligonukleotide auf einem Chip positionieren, erlauben die Diagnostik mit Hilfe von Hybridisierungsreaktionen. Hierbei wird die Patientenprobe gegen einen Array mit erfindungsgemäßen Oligonukleotiden, die die erfindungsgemäßen

Polymorphismen einschließen, getestet. Positive Signale auf dem Array bei Oligonukleotiden, die mit Entzündungserkrankungen gekoppelte Polymorphismen aufweisen, lassen eine entsprechende Diagnose zu.

- 5 Schließlich sind Oligopeptide Gegenstand der vorliegenden Erfindung, die mindestens 20, stärker bevorzugt mindestens 30 und noch stärker bevorzugt mindestens 50 Aminosäuren umfassende Teilabschnitte der gemäß Figur 1
- 10 offenbarten Proteinsequenzen, insbesondere Sequenzen mit den Nummern 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, ..., 1.20. Derartige Teilsequenzen können nach dem Fachmann geläufigen Verfahren bspw. chemisch synthetisiert werden und können vorzugsweise als Antigene für die Produktion von
- 15 Antikörpern eingesetzt werden. Vorzugsweise wird es sich bei diesen Teilabschnitten von erfindungsgemäßen Proteinen bzw. deren Derivaten, Allelen oder Fragmenten offenbarten Sequenzen handeln, die im räumlichen Modell der Proteine solche Regionen besetzen, die zumindest teilweise die Proteinoberfläche ausmachen. Bevorzugte
- 20 Teilsequenzen von mindestens 20 AS Länge werden zumindest tw. die PYD-Domäne (s. Figur 7) (oder im Falle der Proteine der Klasse der NALP-Proteine die NAD-Domäne) der erfindungsgemäßen Proteine umfassen, insbesondere bevorzugt wird ein erfindungsgemäßer Teilabschnitt
- 25 mindestens 20 AS lange Peptide einer der erfindungsgemäßen Sequenzen gemäß Figur 7 zwischen Position 1 und Position 30 (gemäß Figur 7) aufweisen, bspw. das Peptid LENLPAEELKKFKLLSVPL (Position 1 bis 21, 21 AS Länge von humanem Pycard) oder die
- 30 entsprechenden aus Figur 7 entnehmbaren Sequenzen der weiteren erfindungsgemäßen Sequenzen, insbesondere aus der Klasse der NALP-Proteine.

- 35 Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Figuren näher erläutert:

Figur 1 stellt DNA-Sequenzen (einschließlich der entsprechenden Aminosäuresequenzen) dar, die an der inflammatorischen Signalkaskade beteiligt sind.

5 Fig. 2 zeigt eine Zusammenfassung der vorgenannten Sequenzen in tabellarischer Form, geordnet nach den in Fig. 1 bereits verwendeten Bezeichnungen, wobei etwaige EST-Klone, die Herkunft der Sequenz, die Lokalisierung auf einem Chromosom sowie eine Zusammenfassung der in den  
10 jeweiligen Sequenzen enthaltenen Domänen (z. B. die PYD-Domäne, SPRY-Domäne, CARD-Domäne, NACHT-Domäne, die LRR-Domäne) angegeben sind. Unter (A), (B) und (C) sind die Sequenzen humanen Ursprungs zusammengefaßt, (D) enthält dagegen murine Sequenzen.

15 Fig. 3 zeigt das generalisierte "PYD"-Suchprofil, das eingesetzt wurde, um weitere PYD-Proteine in bspw. EST-Datenbanken aufzufinden. Hierbei wird auf die Veröffentlichung von Bucher et al. (1996, Computer Chem.,  
20 20, 3-24) und auf die entsprechenden Erläuterungen in der offengelegten deutschen Patentanmeldung DE 197 13 393.2-41 verwiesen, die beide insoweit Bestandteil der vorliegenden Anmeldung sind. Hierdurch wurden zwei weitere PYD-enhaltende Proteine identifiziert, nämlich  
25 NALP1 und NALP2 (die Bezeichnung NALP setzt sich aus den einzelnen in beiden Proteinen auftretenden charakteristischen Domänen zusammen: Domäne NACHT, LRR und PYD). Beide Proteine spielen eine entscheidende Rolle als Signaltransduktionsproteine für inflammatorische  
30 Signale. Des weiteren kommt auch deren Funktion und damit Verwendung im Zusammenhang mit der apoptotisches Signalproteintransduktion in Betracht.

Im Ergebnis zeigt Fig. 4, daß Pycard mit Hilfe seiner  
35 PYD-Domäne homodimerisiert und mit der PYD-Domäne von NALP1 interagiert. In der mittleren Darstellung wurden Zellextrakte, lysiert 24 Stunden nach der Transfektion, herangezogen und die anti-Flag-Immunopräzipitate auf die

Anwesenheit von VSV-Pycard untersucht. In der unteren Darstellung wurden die verschiedenen Flag-markierten Konstrukte (nämlich Pycard-PYD (also PYD von Pycard)), RAIDD, Apaf1-CARD (CARD von Apaf1, NALP1-PYD (PYD von NALP1), NALP1-CARD (CARD von NALP1) und ein Scheinvektor, in Hinblick auf ihre jeweilige Anwesenheit im Immunopräzipitat durch anti-Flag-Antikörper untersucht.

Fig. 5 zeigt im Teil A eine Ausrichtung von PYD-Domänen aus verschiedenen Proteinen ("alignment" vom N-Terminus zum C-Terminus). Die jeweiligen Sequenzpositionen mit einer mindestens 50%igen Identität bzw. mit zumindest ähnlichen Aminosäuren sind schwarz bzw. mit grauem Hintergrund unterlegt. Die Abkürzungen stehen für HS: homo sapiens und DR: Danio rerio (Zebrafisch). Die jeweiligen Zugangsnummern bei der Datenbank "Gen Bank" (EMBL) sind die folgenden: AF310103 für humanes Pycard, AF310104 für murines Pycard, O15553 für Pyrin, AF310105 für NALP1, AF310106 für NALP2, AAF66964 für das Protein CASPY vom Zebrafisch, AAF66956 für das Protein Pycard vom Zebrafisch.

Fig. 5B stellt in schematischer Weise die Domän-Struktur von Proteinen mit einer PYD-Domäne (Pyrin-Domäne) dar. Die Namensgebung für die einzelnen Homologiedomänen ist zu entnehmen der Figurenlegende in Anlage A12 unter Fig. 5.

Fig. 5C stellt die Aminosäuresequenz von NALP1 dar. Die verschiedenen Schattierungen entsprechen den für Fig. 5B gewählten domänenspezifischen Schattierungen: dunkelgrauer Hintergrund: PYD-Domäne, eingerahmter heller Hintergrund NACHT-Domäne, hellgrauer Hintergrund: LRR-Domäne und dunkler Hintergrund: CARD-Domäne.

Fig. 6 stellt eine Ausrichtung ("alignment") von repräsentativen Pyrin-Domänen (PYD-Domäne) Todeseffektordomäne (DED) und Caspase-Rekrutierungsdomän

(CARD) und Todesdomäne (DD) dar. Die Ähnlichkeit der verschiedenen Domänen wird durch korrespondierende Aminosäuren, die schattiert dargestellt sind, deutlich. Auch auf dem Niveau der Sekundärstruktur gibt es erhebliche Ähnlichkeiten, wie durch die Sekundärstruktur-Vorhersage (hier für jeweils 6  $\alpha$ -Helices) deutlich wird.

Fig. 7 stellt eine Ausrichtung (vom N- zum C-Terminus, "alignment") von Aminosäuresequenzen der PYD-Domänen der folgenden Proteine dar: Pyrin, vom Menschen (hs), von der Maus (mm) und rn, Pycard vom Menschen und von der Maus menschliches Pyc, menschliches NALP1, menschliches NALP2, menschliches NALP3, menschliches NALP4, menschliches NALP5, menschliches NALP6, menschliches NALP7, menschliches NALP8, menschliches NALP9, menschliches NALP10, menschliches NALP11, murines NALP12, menschliches NALP13, murines NALP14, menschliches NALP15, menschliches PY10, murines PY16, CASPY1 vom Zebrafisch, CASPY2 vom Zebrafisch, Pycard vom Zebrafisch. In der letzten Zeile ist eine Hervorhebung der in einer Consensus-Sequenz auftretenden Sequenzposition markiert.

Fig. 8 stellt einen Stammbaum der identifizierten PYD-Domänen enthaltenden Proteine dar, wobei die Nähe des Verwandtschaftsgrades in diesem Stammbaum berücksichtigt ist. Damit zeigt der Stammbaum die vermeintliche Divergenz von durch genomischen evolutionär bedingten Duplizierungen erhaltenen Stammbaums.

Figur 9 zeigt, daß Pycard und NALP1 assoziieren und proinflammatorische Caspasen aktivieren können. Figur 9a stellt hierbei in schematisierter Form die Domänenstruktur von Apaf-1, NOD1, erfindungsgemäßem NALP1 und erfindungsgemäßem Pycard (Asc) dar. Die beiden aus dem Stand der Technik bekannten Proteine Apaf-1 und NOD1 weisen eine strukturelle Verwandtschaft mit den erfindungsgemäßen Proteinen auf. Hierbei sind die einzelnen Domänen mit Ihren Kurzbezeichnungen in Figur 9a

eingezeichnet, nämlich die Domänen CARD, PYD (Pyrin-Domäne), LRR ("Leucin-Rich"-Repeats), NBS (Nukleotid-Bindungsdomäne), WD-Domänen und eine in allen erfindungsgemäßen Proteinen der NALP-Klasse auftretende und hochkonservierte Domäne NAD (NALP-assozierte Domäne). Die erfindungsgemäßen Proteine NALP1 und Pycard weisen darüber hinaus jeweils die charakteristische PYD-Domäne auf, über die die beiden Proteine erfindungsgemäß interagieren können.

10

Figur 9b stellt dar, daß die erfindungsgemäßen Proteine NALP1 und Pycard nicht an der Aktivierung von NF- $\kappa$ B beteiligt sind. Hierzu wurden 293T-Zellen mit Plasmidkonstrukten von NOD1, RIP2, NALP1, NALP1-Nter, NALP1-Cter und Pycard sowie mit einem "Mock"-Vektor und mit NF- $\kappa$ B-Luziferase-Reporter-Plasmiden transfiziert und die relative NF- $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität 24 Stunden nach Transfektion ermittelt. Es ist ohne weiteres erkennbar, daß ausschließlich die beiden Proteine NOD1 und RIP2 an der Induktion der NF- $\kappa$ B-Aktivierung beteiligt sind, während die erfindungsgemäßen Proteine NALP1 (bzw. Fragmente von NALP1) und Pycard eine Transkriptions-Aktivität auf dem Niveau des Mock-Vektors aufweisen, also NF- $\kappa$ B nicht aktivieren.

25

Figur 9c stellt in der linken Auftragung Blots von überexprimiertem NALP1 Cter (AS 1030 bis 1430, die die NAD und CARD-Domäne enthalten) dar, wodurch eine Caspase-5 Prozessierung induziert wird. Hierzu wurden 293T-Zellen mit 0,5  $\mu$ g eines Caspase-5-Plasmids und der indizierten Menge an NALP1-Cter-, Pycard- oder FADD-Expressionsplasmiden transfiziert. Im dargestellten Western-Blot wurde Caspase-5 mit anti-Caspase-5-Antikörper bzw. NALP1 mit anti-Flag-Antikörper detektiert. Bei einer Menge von 3  $\mu$ g NALP1-Cter-

35

Expressionsplasmid war ein Expressionssignal der Procaspase im Zellextrakt bei Verwendung von anti-Caspase-5-Antikörpern kaum noch erkennbar, d.h. Caspase-5 war weitestgehend prozessiert worden. In der mittleren  
5 Auftragung von Figur 9c ist erkennbar, daß NALP1 mit Caspase-5 interagiert. Hierzu wurde Caspase-5 (2 µg) mit 2 µg der indizierten Flag-markierten Expressionskonstrukte koexprimiert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die anti-Flag (M2)-Immunopräzipitate  
10 (IP) im Hinblick auf die Anwesenheit von Caspase-5 analysiert, und die Zellextrakte (xt) wurden mit den angegebenen Antikörpern immunogeblottet. Während im Zellextrakt (unterer Abschnitt der mittleren Figur) bei Koexpression mit NALP1-Cter kein Caspase-5-Signal nach  
15 Einsatz von anti-Caspase-5-Antikörpern erkennbar war, geben die übrigen Versuchsansätze Banden für Caspase-5. In allen Versuchsansätzen (bis auf den Mock-Vektor) sind die entsprechenden Flag-markierten Konstrukte durch anti-Flag-Antikörper nachweisbar. Im Immunipräzipitat ist  
20 Caspase-5 bzw. p35 nachweisbar. p35 ist ein Caspase-5 Spaltprodukt, das die CARD-Domäne und die p20 Caspase-Untereinheit enthält. Das \* in Figur 9c (mittlere Darstellung, oben) zeigt die Position der IgG schwere Kette an. In der rechten Auftragung von Figur 9c sind die  
25 Interaktion der verschiedenen CARD-Caspasen mit NALP1-Cter und dem Protein Raidd dargestellt. Die beiden vorgenannten Proteine wurden Flag-markiert und mit polyklonalem anti-Flag-Antikörper immunipräzipitiert. Die Caspasen wurden durch ihre HA (Hämagglutinin)-Markierung  
30 detektiert. Eine Bande war für Caspase-5 bei Zugabe von erfindungsgemäßem NALP1-Cter deutlich erkennbar, schwache Signale auch für Caspase-2 und Caspase-4, d.h. die C-terminale CARD-Domäne von NALP1 interagierte am stärksten mit Caspase-5. Mit Caspase-9 konnte keine Interaktion  
35 beobachtet werden.



Figur 9d enthält in der linken Darstellung die Ergebnisse von Versuchen, die zeigen, daß die Überexpression von erfindungsgemäßen Pycard die Spaltung von Caspase-1 induziert. Hierzu wurde analog zu Figur 9c (dort für erfindungsgemäßes NALP1-Cter) das Zellextrakt untersucht. Hierbei zeigte sich, daß bei erhöhten Pycard-Konzentrationen, wie im mittleren Abschnitt von Figur 9d (linke Auftragung) durch anti-Pycard-Antikörper gezeigt, eine deutliche Reduktion der Caspase-1-Konzentration im Zellextrakt nachweisbar war, verglichen mit den übrigen Banden, beispielsweise bei NALP1-Cter Zugabe oder FADD Zugabe. In der rechten Darstellung von Figur 9d wird gezeigt, daß Pycard gemeinsam mit Caspase-1 koimmunopräzipitiert. Der verwendete Antikörper ist gegen den N-terminalen Abschnitt (CARD) von Caspase-1 gerichtet. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die CARD-Domäne von Pycard stark mit der Caspase-1 interagiert und deren Aktivierung anstößt. Erfindungsgemäßes Pycard verbindet also als Adapter NALP1 und Caspase-1.

Figur 10 gibt die Ergebnisse von Experimenten wieder, die zeigen, daß die kombinierte Expression von Caspase-1 und Caspase-5 eine optimale Spaltung von pro-IL1 $\beta$  induziert. Hierbei wurden, wie in Figur 10a dargestellt, 293T-Zellen mit gleichen Mengen von aktivierten Caspase-1 und Caspase-5 Expressionskonstrukten gemeinsam mit entweder leeren Vektoren oder Expressionskonstrukten von NALP1-Cter und Pycard kotransfiziert. Die Caspase-induzierte Spaltung von pro-IL $\beta$  nach Aspartat 116 wurde unter Einsatz von Antikörpern, die spezifisch das p17 Spaltprodukt (IL-1 $\beta$ \*) von pro-IL1 $\beta$  binden können, detektiert. Die Zellextrakte wurden dann immunogelblottet, um die Expressionsniveaus der transfizierten Proteine bestimmen zu können. Hierbei zeigt sich im „Western Blot“ von Figur 10a, daß bei einer Kombination von Pycard,

NALP1-Cter, Caspase-1 und Caspase-5 mit Hilfe von anti-IL1 $\beta$ \*-Antikörpern IL-1 $\beta$ \* detektiert werden kann (s. Figur 10a oben). Die beiden Bildausschnitte im unteren Teil von Figur 10a geben die Kontrollexperimente mit Anti-Flag bzw. Anti-Pycard-Antikörpern wieder. Diese Ergebnisse entsprechen der Verteilung der entsprechenden Zielproteine in den vier Versuchsansätzen. Das Caspase-5-Spaltprodukt p35 ist mit anti-Caspase-5-Antikörper deutlich sichtbar nur in der rechten Spur der Auftragung in Figur 10a nachweisbar.

Figur 10b entspricht Figur 10a abgesehen davon, daß gleiche Mengen der Aktivatoren NALP1-Cter und Pycard mit pro-IL1 $\beta$  kotransfiziert wurden und daß die Caspasen jeweils eigenständig exprimiert oder coexprimiert (rechte Spur) wurden. Das Spaltprodukt IL1 $\beta$ \* ist nur im Western Blot in der rechten Spur, also nach Coexpression, mit den entsprechenden Antikörpern nachweisbar.

Figur 11 stellt die parallele Aktivierung von Caspase-1 und Caspase-5 während der pro-IL1 $\beta$  Prozessierung in THP.1 Zellen, also unter physiologischen Bedingungen, dar. Hierbei wurde zunächst gemäß Figur 11a die Expression von NALP1, Pycard und Caspase-1 in verschiedenen Zelllinien durch Western-Blot-Analyse untersucht (293T-Zellen, Jurkat-Zellen, EL4-Zellen, A20, Raji-, Ramos-, BJAB-, THP-1-, U937-, K562-, Raw-, HeLa-Zellen). Hierzu wurden die Zellektrakte (30  $\mu$ g) mit polyklonalen Antikörpern gegen NALP1 sowie Pycard und monoklonalen Antikörpern gegen Caspase-1 versetzt. Die vorgenannten Zelllinien sind alle humanen Ursprungs, abgesehen von den Lymphozyten-Zelllinien A20 und EL4, die von Mäusen stammen. Das \* bezieht sich auf ein Protein, das mit dem anti-Pycard-Antikörper kreuzreagiert und das wahrscheinlich einer kürzeren, alternative Spleißversion

von Pycard entspricht. In der rechten Auftragung von Figur 11a wurde eine Spezifitätskontrolle der in dieser Untersuchung verwendeten Antikörper durchgeführt. Hierzu wurden 293T-Zellen mit NALP1 und Pycard oder einem Mock-  
5 Expressionskonstrukt transfiziert, und die Zellysate wurden mit dem entsprechenden Antikörper versetzt. Insgesamt zeigte sich bei den in Figur 11a dargestellten Versuchen, daß THP-1-Zellen eine starke Expression sowohl von NALP1, von Pycard als auch von Caspase-1 besitzen.  
10 Sie eignen sich daher besonders als Untersuchungsobjekt für die Interaktion von NALP1, Pycard und Caspase-1. Die Spezifität der Antikörper ist, wie aus der rechten Auftragung in Figur 11a hervorgeht, ausgezeichnet.

15 In Figur 11b wurde die Expression von IL1 $\beta$  und Caspase-5 vor und nach Stimulierung mit LPS (1  $\mu$ g/ml, 1h, Bedingungen wie im folgenden für Figur 11c beschrieben, dargestellt). Nach Stimulierung mit LPS ist hierbei im Zellextrakt mit den entsprechenden Antikörpern sowohl  
20 Caspase-5 als auch pro-IL1- $\beta$  nachweisbar. THP1-Zellen exprimieren Caspase-5 jedoch auch ohne LPS-Aktivierung.

Figur 11c gibt die Ergebnisse von Versuchen wieder, die sich ergeben, wenn Zellysate von mit LPS prästimulierten  
25 THP.1-Zellen bei 30°C für die in Figur 11c oben dargestellten Zeiträume inkubiert wurden. Caspase-1-Aktivierung ist nämlich spontan zu beobachten, wenn cytoplasmatische Zellextrakte auf 30°C erwärmt werden. Es wurde die Aktivierung von Caspase-1, Caspase-5, Caspase-9  
30 und pro-IL1 $\beta$ , gefolgt vom Western Blotting in Gegenwart oder Abwesenheit von Caspase-Inhibitoren zVADfmk (50  $\mu$ M), YVADfmk (5  $\mu$ M) und Proteasom-Inhibitor LLnL (50  $\mu$ M) zeitabhängig ermittelt. Cytochrom C (1 ng) wurde zur Aktivierung von Apaf-1 und Caspase-9 hinzugegeben. Die  
35 monoklonalen Antikörper, die eingesetzt wurden, um

Caspase-5 und Caspase-9 zu detektieren, erkennen jeweils die p20-Untereinheit. In den vier Bildabschnitten der Figur 11c sind die jeweiligen Banden, die durch Markierung mit anti-Caspase-1-Antikörper, anti-Caspase-5-Antikörper, anti-Caspase-9-Antikörper und anti-IL1 $\beta$ -Antikörper erhalten werden, dargestellt. Hierbei ergab sich, dass Caspase-9 nur prozessiert wurde, wenn Cytochrom C dem Zellextrakt hinzugegeben wurde. Die Caspase-1 und Caspase-5 hingegen zeigen ähnliche Kinetiken, weswegen beide auf einem Caspase-9-unabhängigen Signaltransduktionsweg aktiviert werden. Die Caspasen-1 und -5 werden jeweils zeitabhängig nach Aktivierung in ihre Spaltprodukte zerlegt (p20, p35, Nter). Gleichzeitig mit der Aktivierung der Caspasen-1 und -5 (Auftreten der Spaltprodukte) kann das p17-Fragment (aktives Spaltprodukt von proIL-1 $\beta$ ) detektiert werden. Bei Zugabe der beiden Caspase-1-Inhibitoren zVADfmk und YVADfmk wurde die proIL-1 $\beta$ -Aktivierung blockiert.

Schließlich sind in Figur 11d die Caspase-1, Caspase-5 und pro-IL1 $\beta$ -Aktivierung nach Stimulierung von THP1-Zellen durch LPS (10  $\mu$ g/ml) (anstelle der Erhöhung der Inkubationstemperatur, wie in Fig. 11c) wiedergegeben. Die THP1-Zellen wurden mit PMA vor der LPS-Zugabe prästimuliert. Die Aktivierung von pro-IL1 $\beta$ , Caspase-1 und Caspase-5 wurde sowohl in den Zellextrakten (xt) als auch in den Überständen (SN) gemessen. Die oberen drei Bildausschnitte stellen dabei die Messung in den Überständen (SN) dar, die unteren vier Bildausschnitte Messungen der Anwesenheit in Zellextrakten. Die einzelnen Spuren entsprechen unterschiedlichen Stimulationszeiträumen (mit oder ohne Zugabe von Caspase-Inhibitor zVAD). Die jeweils zur Detektion eingesetzten Antikörper sind links von den Bildausschnitten

verzeichnet, die entsprechenden Bandenpositionen sind rechts durch entsprechende Pfeile namentlich indiziert. PARP (unterster Bildausschnitt) ist ein Spaltprodukt, das der Caspase-3-Aktivierung erkennen läßt. Die Spaltung von pro-IL1 $\beta$  wurde durch einen Antikörper, der spezifisch die 5 gespaltene Form von pro-IL1 $\beta$ , also IL1 $\beta^*$ , erkennt, detektiert (anti-IL1 $\beta^*$ ). Während in den Zellextrakten keine aktiven Formen von Caspase-1 oder Caspase-5 auftreten, sind diese ebenso wie die aktive Form p17 10 (aktives Spaltprodukt von proIL-1 $\beta$ ) in den Überständen nachweisbar. D.h. aktive Formen von Caspase-1 und Caspase-5 werden aus den Zellen gemeinsam mit p17 in den Überstand sezerniert. Eine Spaltung (Aktivierung) von PARP als proapoptotisches Signal (unterster 15 Bildausschnitt) findet dagegen erwartungsgemäß nicht statt.

Um zu überprüfen, ob NALP1, Caspase-1, Caspase-5 und Pycard tatsächlich zur Aktivierung von proIL-1 $\beta$  20 zusammenwirken, wurden nicht-aktivierte Zellextrakte von THP1-Zellen mit Gelfiltrationsmethoden untersucht. Figur 12 stellt Ergebnisse dar, die zeigen, dass die Bildung eines Komplexes stattfindet, der NALP1, Pycard, Caspase-1 und Caspase-5 enthält, das sogenannte Inflammosom. 25 Hierbei beruhen die in Figur 12a dargestellten Ergebnisse auf folgenden Versuchsansätzen: THP1-Zellysate wurden für die Dauer von 60 min bei 30°C inkubiert; diese Bedingungen führten zu spontaner Aktivierung von pro-IL1 $\beta$  (s. Figur 11b). Hierzu wurden Zellextrakte 30 größenfraktioniert auf Superdex S-200 Säulen. Das Elutionsmuster von NALP1, Pycard und Caspase-1 in den Zellextrakten vor und nach der Aktivierung, d.h. nicht stimuliert und stimuliert, ist dargestellt. Die weißen Pfeile geben die Elutionspositionen der Proteine, die zu 35 einem Komplex von höherem Molekulargewicht hin verschoben

sind an (Inflammosom-Fractionen 19 und 20). In der Kopfzeile von Figur 12a ist der Standard wiedergegeben (in kDa), also die Positionierung entsprechend großer Proteine in den einzelnen Fraktionen. Die verschiedenen Bildausschnitte geben die Elutionsprofile für NALP1, Pycard, Caspase-1 und FADD (letzteres zu Vergleichszwecken) wieder. Figur 12a zeigt, dass NALP1 (mit einem theoretischen Molekulargewicht von 156kDa) bereits ohne Stimulierung als Multiproteinkomplex vorliegt (ca. 700 kDa). Nach Auslösung der Caspase-1-Aktivierung kann eine deutliche Verschiebung des NALP1-Komplexes zu einem höheren Molekulargewicht (ca. 700 kDa) beobachtet werden. Auch Pycard und Caspase-1, die im nicht-stimulierten Zustand erwartungsgemäß bei ca. 30 kDa bzw. 60 kDa eluieren, werden nach Stimulation zumindest tw. auch in der 700 kDa-Fraktion, enthaltend NALP1, beobachtet. NALP1, Pycard und die beiden Caspasen Caspase-1 und Caspase-5 bilden das Inflammosom.

Figur 12b zeigt, daß NALP1, Pycard, Caspase-1 und Caspase-5 einen Komplex bilden, und zwar zeitabhängig. Hierbei wurden Extrakte von THP1-Zellen für verschiedene Zeiträume, wie in der Kopfzeile von Figur 12b wiedergegeben, stimuliert, indem bei 30°C inkubiert wurde. Die Immunopräzipitation erfolgte durch anti-Pycard-Antikörper (linke Auftragung) oder anti-NALP1-Antikörper (rechte Auftragung). Es wurde dann mit Hilfe der in Figur 12b jeweils dargestellten Antikörper im Western Blot die Anwesenheit von Caspase-1, Caspase-5 bzw. NALP1 untersucht. Wiederum sind rechts von den dargestellten Bildausschnitten die Positionen der dort zu erwartenden Proteine oder Proteinfragmente dargestellt (s.o.). Im Ergebnis coimmunopräzipitiert Caspase-1 entweder mit Pycard oder mit NALP1 in THP1-Zellextrakten in aktivierungsabhängiger Weise. Im Unterschied zum Zellextrakt lag im Immunopräzipitat im wesentlichen die

prozessierte (aktivierte) Form von Caspase-1 vor. Die Caspase-1-Bindung ist transient, da 2h nach der Stimulierung deutlich weniger Caspase-1 im Inflammosom nachweisbar war. Neben Caspase-1 immunopräzipitieren  
5 anti-Pycard-Antikörper auch die Caspase-5 und NALP1 abhängig von der Stimulation.

Figur 13 gibt Ergebnisse wieder, die zeigen, daß Pycard (und NALP1) für die Caspase-1- und Caspase-5-Aktivierung  
10 in THP1-Zellen unerläßlich ist. Hierzu wurden gemäß Figur 13a THP1-Zellysate bei 30°C für verschiedene Zeiträume und in Anwesenheit oder Abwesenheit von gegen beispielsweise Pycard oder NALP1 gerichteten Antikörpern und weiteren Kontroll-Antikörpern (MLTparacaspase,  
15 TRAMP/DR3, RIP2) stimuliert. Die Aktivierung von Caspase-1 wurde dann, wie in Figur 11b, beschrieben weiterverfolgt. In den beiden Bildabschnitten der Figur 13a ist oben ein Western Blot mit anti-Caspase-1-Antikörpern und unten ein Western Blot mit anti-Caspase-  
20 5-Antikörpern zu sehen. Im Ergebnis zeigte sich, dass die Zugabe von anti-Pycard-Antikörpern zu Zellextrakten die Caspase-1-Aktivierung sofort herunterreguliert, die anderen zur Kontrolle eingesetzten Antikörper hingegen keinen Effekt bewirken. Anti-Pycard- oder anti-NALP1-  
25 Antikörper bewirkten eine Inhibierung der Caspase-5-Aktivierung.

Figur 13b gibt die Dosisabhängigkeit der durch anti-Pycard-Antikörper erzielten Inhibition der Caspase-5  
30 Aktivierung wieder. Diese Antikörper in entsprechenden Konzentrationen führen dazu, daß das p20-Spaltprodukt von Caspase-5 nicht mehr im Western Blot mit entsprechenden Antikörpern detektierbar ist. Der inhibitorische Effekt von anti-Pycard-Antikörpern war also dosisabhängig.

35

Die Ergebnisse in Figur 13c bestätigen, daß anti-Pycard-Antikörper nicht mit der Cytochrom c-vermittelten Caspase-9-Aktivierung interferiert (die experimentellen Bedingungen sind im Zusammenhang mit Figur 11 beschrieben). Das Caspase-9-Spaltprodukt p20 ist mit anti-Caspase-9-Antikörpern nämlich weiterhin detektierbar, es findet also keine Inhibition statt.

Figur 13d stellt die Ergebnisse von Versuchen dar, bei denen THP1-Zelle extrakte mit Protein G-adsorbierten, gegen Pycard oder NALP1 oder als Kontrolle Ig gerichteten Antikörpern inkubiert wurden. Nach der Entfernung der entsprechenden Kügelchen wurde der Immunniederschlag von Pycard und NALP1 durch Western-Blot-Analyse untersucht. Die Caspase-1-Aktivierung wurde dann durch eine Temperaturerhöhung von 0° auf 30°C hervorgerufen. Hierbei wird Caspase-9 nur aktiviert (also p20 vorhanden), wenn Cytochrom C den Proben hinzugegeben wird. Wenn Pycard durch Zugabe von entsprechenden Antikörpern aus dem Zellextrakt durch Fällung vor der Stimulierung entfernt wird, wurde die Caspase-1-Aktivierung vollständig blockiert. Trotz unvollständiger Fällung von NALP1 mit Hilfe entsprechender Antikörper wurde dennoch eine signifikante Reduktion der Caspase-1-Aktivierung beobachtet.

Figur 14 gibt die Inhibierung der pro-IL1 $\beta$  Prozessierung durch dominant negative Varianten von Pycard (DN) wieder. Gemäß Figur 14a wurden THP1-Zellen durch Verwendung eines retroviralen Vektors, der die Flag-markierte Pyrin-Domäne (Aminosäuren 1 bis 94, ohne CARD-Domäne) von Pycard und ein Resistenz-Gen gegen Puromycin kodiert, infiziert. Dieses Konstrukt ohne CARD-Domäne bindet an NALP1, aber nicht an Caspase-1, ist also eine erfindungsgemäße Verbindung zur Blockade der NALP1/Pycard-induzierten Caspase-1-Aktivierung. Nach Selektion mit Puromycin



wurden stabil transfizierte Zellpopulationen im Hinblick auf ihre Expression von Flag-markierten Proteinen durch Western-Blot-Analyse untersucht (gemäß Figur 14a sind zwei verschiedene Populationen dargestellt). Gemäß Figur 14a erhaltene stabil transfizierte Zellen, die DN-Pycard exprimieren, wurden mit LPS (10 µg/ml) für die angegebenen Zeitabschnitte behandelt, und die Prozessierung von Caspase-1, Caspase-5 und pro-IL1β in den entsprechenden Zellüberständen (SN), wie in Figur 11d beschrieben, bestimmt. In den linken Spuren wurde DN-Pycard hinzugegeben, in den rechten Spuren ein Mock-Vektor als Kontrolle.

In dem oberen Bildausschnitt von Figur 14b ist deutlich erkennbar, daß prozessiertes IL1β\* in den angegebenen Stimulationszeiträumen nur dann auftritt, wenn entsprechende Mock-Konstrukte eingesetzt wurden, dagegen konnten nur ganz schwache Signale bei Anwesenheit von DN-Pycard beobachtet werden. Auch im Hinblick auf Caspase-1 und Caspase-5 sind die prozessierten Formen im Falle einer Zugabe von DN-Pycard nur in geringen Mengen nachweisbar, es findet also keine Aktivierung (Sekretion) der Caspasen-1 und -5 statt. Dagegen hatte die expression von DN-Pycard keine Wirkung auf die LPS-induzierte NF-kB-Aktivierung oder die pro-IL1β-Synthese.

Die beigegefügt, Anlagenblätter A1 bis A9 ist Bestandteil der vorliegenden Offenbarung.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Ausführungsbeispiele näher charakterisiert:

### Ausführungsbeispiele

1. Ausführungsbeispiel

Um zu überprüfen, ob die PYD-Domänen - wie auch die Domänen DD, DED, CARD - die Eigenschaft haben, nur mit Mitgliedern innerhalb der eigenen Familie von "6-Helix-Bündel-Proteinen" zu interagieren, wurden Expressionsvektoren für PYD-Proteine hergestellt und mit Coimmunopräzipitations-Experimenten ihre Eignung zur Interaktion mit anderen Proteinen überprüft. Hierzu wurden Pycard-Konstrukte durch PCR-Techniken aus den folgenden IMAGE-EST-Klonen amplifiziert: AA528254(965955) und AI148558(1714818). Pycard wurde mit den folgenden Primern amplifiziert: JT1509 5'-ATGGGGCGCGCGCGAC-3' und JT1512 5'-TCAGCTCCGCTCCAGG-3'. Die PYD-Domäne von Pycard wurde mit JT1509 und JT1510 5'-CGACTGAGGAGGGGCC-3' amplifiziert.

NALP1-Konstrukte wurden mit PCR-Methoden amplifiziert, indem die KIAA0926-EST-Klone aus dem Kazusa-DNA-Research Institut als "Template" verwendet wurden. NALP1-PYD wurde mit JT1497 5'-ATGGCTGGCGGAGCCTGGGGCCGCCTGGCCTGTTACTTG-3' und JT1525 5'-GATCCAGGGCATTAGCAC-3' amplifiziert. NALP1-CARD wurde mit JT1500 5'-GTTGATACTTCAGCTGCTGAGTGGCAGGAG-3' und JT1527 5'-GATGAGACTCTGGTGTGG-3' amplifiziert.

Die amplifizierten Fragmente wurden in PCR-Zero-Blunt (von Invitrogen) ligiert und in der EcoR1-Schnittstelle von VSV oder Flag, die die PCR-3 (von Invitrogen) abgeleiteten Vektoren enthalten, subkloniert, wie bei Thome et al. (1999, J. Biol. Chem., 274, 9962-8) beschrieben. Die anderen eingesetzten Konstrukte wurden bereits vorher bei Thome et al. (1999 J. Biol. Chem., 274, 9962-8) beschrieben und sind in Hinblick auf die Darstellung der experimentellen Ausführung Bestandteil der vorliegenden Offenbarung. Die Veröffentlichung von Burns et al. (1998, J. Biol. Chem., 273, 12203-12209) beschreibt die Durchführung der Immunopräzipitation. Sie ist gleichfalls Bestandteil der vorliegenden Offenbarung und läßt sich zusammengefaßt so darstellen:

293T-Zellen, die in DMEM-Medium kultiviert wurden, das mit 10%igen fötalem Kälberserum Glutamin ergänzt wurde, wurden mit einer Dichte von  $1-3 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm-  
5 Platte angesetzt und mit 3µg des jeweiligen Konstrukts am nächsten Tag durch die Calciumphosphat-Präzipitationsmethode transfiziert. Die Zellen wurden gesammelt und in Lyse-Puffer 24 bis 26 Stunden nach der Transfektion lysiert (der Lysepuffer enthält 0,2% NP40,  
10 150mM NaCl, 50mM EDTA, 30mM Tris, pH 7,4). Die Zell-Lysate wurden für mindestens drei Stunden auf Sepharose 6B (von Pharmacia) vor der Präzipitierung mit einer gleichen Menge von Proteinen bei 4°C für 4 Stunden mit 3µl einer Flag-Agarose (von Kodak International  
15 Biotechnology) von 3µl von Sepharose 6B Kügelchen vorgereinigt. Das Harz wurde sechsmal in Lysepuffer gewaschen und nach der letzten Wäsche wurde gebundenes Protein durch Kochen im Probenpuffer eluiert, separiert durch SDS-PAGE und auf Nitrocellulose transferiert (von  
20 Hybond ECL, Pharmacia), um nachfolgend das Western-Blotting durchführen zu können. Die anti-VSV und anti-Flag-Antikörper stammen von Sigma. Ein HRP-konjugierter Antikörper wurde eingesetzt, der spezifisch die schweren Ketten von murinem IgG1 (von Southern Biotechnology  
25 Associates) detektierte.

Wie in Fig. 4 als Ergebnis des vorliegenden Ausführungsbeispiels gezeigt, konnte eine spezifische Bindung von Pycard mit dem PYD-Domän von Pycard und NALP  
30 dann detektiert werden, wenn eine Coexpression mit VSV-markiertem Pycard, Flag-markierten Konstrukten, die entweder die PYD-Domäne von Pycard oder die PYD-Domäne von NALP1 enthalten coexprimiert wurden. Dagegen wurden keine Interaktion der PYD-Domäne von Pycard mit anderen  
35 PYD-Domänen oder mit Todesdomänen, CARD-Domänen oder Todeseffektordomänen (letzteres ist in Fig. 4 nicht dargestellt)

festgestellt. Daher interagiert eine PYD-Domäne spezifisch mit PYD-Domänen über eine Protein-Protein-Wechselwirkung. Im Ergebnis zeigt Fig. 4 also, daß Pycard mit Hilfe seiner PYD-Domäne homodimerisiert und mit der  
5 PYD-Domäne von NALP1 interagiert.

## 2. Ausführungsbeispiel

10 NALP1 Cter (AS 1030 bis 1430, der NAD- und der CARD-Domäne entsprechend), wurde mit Hilfe von JT1658 (5'-aaactcctggacgtgagcaag-3') und JT1500 (5'-tcagctgagtggcaggag-3') amplifiziert und in dem Säugerexpressionsvektor pCR3 im entsprechenden Leseraster  
15 mit der "tag"-Markierung subkloniert. In ähnlicher Weise wurde NALP1 Nter (AS 1 bis 665, entsprechend der Pyrin- und der NBS-Domäne) mit Hilfe der Primer JT1497 (5'-atggctggcggagcctggggc-3') und JT1526 (5'-caggcctagtattccata-3') amplifiziert. Die  
20 Expressionskonstrukte für Caspase-4, Caspase-1, und Caspase-9, Flag-markiertem RIP2, Apaf1, RAIDD, Bcl10, IL-1 $\beta$ , wurden entsprechend der Beschreibung bei Thome et al. (Current Biology 8, 885 (1998) und Thome et al. (J. Biol. Chem. 274, 9962 bis 9968 (1999)) zur Verfügung gestellt.  
25 Die Plasmide, die für Caspase-5 und NOD1 kodieren, stammen von Christoph Fröhlich bzw. Gabriel Nunez (Department of Pathology, Univ. of Michigan Med School, 1500 E. Medical Center, Ann Arbor, MI 48109, USA).  
Transiente Transfektion von 293T-Zellen, die Zellyse, die  
30 Immunopräzipitationsanalyse, das "Immunoblotting" und der NF- $\kappa$ B-Assay wurden so durchgeführt wie bei Thome et al. (Current Biology 8, 885 (1998)) beschrieben, worauf ausdrücklich Bezug genommen wird und was in die Offenbarung referenziell eingeschlossen ist. Die  
35 vorgenannten Verfahren wurden wie an vorzitiertem Stelle beschrieben, durchgeführt, abgesehen von der Verwendung

von Ig schwerkettenspezifischen Antikörpern (HRP-konjugierten Ziegen-anti-Maus IgG1 und Ziegen-anti-Kaninchen IgG als Sekundärreagenz im Rahmen des "Western-Blottings" (Southern Biotechnology, Birmingham, GB).

5

Polyklonale Antikörper wurden durch Injektion von MAP-Peptiden, die den Aminosäuren 2 bis 25 von NALP1, den Aminosäuren 2 bis 27 von Pycard entsprechen in Kaninchen (Eurogentec, Belgien) und nachfolgender Immunoreinigung auf den entsprechenden Peptiden hergestellt. Der monoklonale Antikörper, gerichtet gegen die CARD-Domäne von Caspase-1, stammt von Junying Yuan (Boston, MA 02115, USA, Harvard Medical School, 240 Longwood Av.)

15

Die weiteren Antikörper wurden von den folgenden Herstellern erworben: Caspase-5 (MBL), Caspase-9, PARP, gespaltenes IL-1 $\beta$  D116 (Cell Signaling), Anti-Flag-Antikörper (M2, Sigma), Anti-VSV-Antikörper (P5D4, Sigma), Caspase-3 (Transduction Laboratories).

20

Zur in-vitro Caspase-1/pro-IL1 $\beta$ -Aktivierung wurden THP.1 Zellen in Suspension in entsprechenden Flaschen in RPMI 1640 Medium, ergänzt mit 10% hitzeinaktiviertem fötalen Rinderserum, 50 $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol und Penicillin/Streptomycin (jeweils 100  $\mu$ g/ml) bis zu einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml aufgezogen und für eine Stunde mit LPS (1  $\mu$ g/ml) prästimuliert. Zytosolische Extrakte wurden, wie bei Liu et al. (Cell 86, 147 - 157, 1996) beschrieben, hergestellt. Zusammenfassend läßt sich hierzu sagen, daß die Zellen in phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen wurden, in 5 Volumina eisgekühltem hypotonischen Puffer W (20 mM Hepes-KOH, pH 7,5, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Na EDTA, 1 mM Na EGTA, und 0,1 mM PMSF) unter Hinzufügung eines Protease-Inhibitor-Cocktails (Roche, Basel, CH) aufquellen

35

konnten. Nach einer 15 min. Eiskühlung wurden die Zellen durch 15-malige Passage durch eine G22-Nadel aufgebrochen. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände filtriert (0,45µ) und für den in-vitro IL-1β Spaltungsassay verwendet.

Die Immunopräzipitation von endogenem Caspase-1/NALP1, Pycard-Interaktionskomplex wurde unter Zuhilfenahme von  $5 \times 10^8$  THP.1 Zellen pro Zeitpunkt durchgeführt. Die in-vitro Inflammosom-Aktivierung wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt. Mit 3 µg des indizierten Antikörpers bei 4°C im Puffer W, mit 20 µl Protein-A-Sepharose CL-4B (Pharmacia) für 4 Stunden, wurde immunopräzipitiert. Die Komplexe wurden durch Zentrifugation wiedergewonnen und 6mal mit dem Puffer W gewaschen. Um Pyrin und NALP1 immunologisch niederzuschlagen, wurden THP.1-Zelleextrakte mit auf Protein-G-Kügelchen adsorbierten Antikörpern für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Nach Entfernung der Kügelchen wurde die Caspase-1-Aktivierung durch Temperaturerhöhung auf 30°C angestoßen.

Die aktivierten Proben (inkubiert bei 30°C) oder die nicht-aktivierten Proben (bei 4°C belassen, Kontrollproben) wurden auf Superdex-200 HR 10/30 Säulen geladen und die Proteine wurden im Puffer W bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,5 ml/min, als 0,5 ml Fraktionen, eluiert. Das "Western-Blotting" wurde nach Chloroform:Methanol-Präzipitierung der Gesamtfraktion durchgeführt. Die Säule wurde mit den folgenden Proteinen als Standard kalibriert: Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalase (232 kDa), Aldolase (158 kDa), Rinder Serum-Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa) und Ribonuclease A (13,7 kDa).

Um eine LPS-Aktivierung der Caspase-1/Pro-IL-1 $\beta$ -Aktivierung zu erreichen, wurden THP.1-Zellen mit 0,5  $\mu$ M PMA (Calbiochem) für die Dauer von 3 Stunden differenziert. Die Zellen wurden gewaschen und auf 24  
5 "Well"-Platten bei einer Dichte von  $4 \times 10^5$  Zellen pro "Well" ausplattiert und dort belassen, um über Nacht sich anheften zu können. Nach dem Waschen im Medium ohne FCS, wurden die Zellen mit LPS 10 $\mu$ g/ml (E.coli 055:B5, Sigma), wie in Fig. 11 gezeigt, behandelt oder nicht behandelt.  
10 Die Zellüberstände und Zellsiederschläge wurden entnommen und durch "Western-Blotting" hinsichtlich verschiedener Caspasen und IL-1 $\beta$  analysiert.

Um stabile Zelllinien herzustellen, wurden Flag-markierte  
15 dominant negative (DN) Formen von Pycard (AS 1 bis 94, entsprechend der Pyrin-Domäne) in MSCV Puromycin-selektierbare retrovirale Vektoren (Clontech) kloniert und ein rekombinantes Virus wurde erhalten und nach Transfektion von 293T-Zellen in Kombination mit einem  
20 Vektor, enthaltend die viralen Strukturgene (VSV-G "Pseudotyping" Vektor), titriert. THP.1-Zellen wurden infiziert, mit Puromycin (5  $\mu$ g/ml) für die Dauer von 2 Wochen selektiert und die Zellpopulationen wurden auf die Proteinexpression, Caspase-1, Caspase-8 und IL-1 $\beta$ -  
25 Aktivierung hin analysiert.

## Anlagen A1 bis A9

5

A1:

In pro-apoptotischen Signaltransduktionskaskaden wird die Wechselwirkung zwischen den verschiedenen Initiatoreinheiten, wie z.B. dem Todesrezeptor Fas, den verschiedenen Adaptorproteinen und den Caspasen in erster Linie durch drei strukturell verwandte Protein-Protein-Domänen, nämlich der Todesdomäne (DD), Todeseffektordomäne (DED) und der Caspaserekrutierungsdomäne (CARD), vermittelt. Im vorliegenden Fall wird der Nachweis erbracht, dass eine vierte verwandte Domäne, die Pyrindomäne (PYD) genannt, existiert. Die PYD wird in Pysin, einem Protein, das bei Patienten mit familiärem Mittelmeerfieber mutiert ist, bei Pycard, einem Regulator der Etoposid-vermittelten Apoptose, bei einer Caspase vom Zebrafisch und in zwei neuen Proteinen (NALP1, NALP2), die strukturell mit dem Apoptose-Regulationsprotein Card4/Nod1 verwandt sind, beobachtet. Für die PYD-Domäne von Pycard wurde nachgewiesen, dass sie homodimerisiert und mit PYD von NALP1 interagiert. Die Identifizierung der PYD-Familienmitglieder kann hierbei zur kurzfristigen Charakterisierung von pro-apoptotischen und/oder pro-inflammatorischen Signaltransduktionswegen beitragen.

## Einführung

Die Apoptose oder der programmierte Zelltod ist ein wesentlicher Vorgang bei Tieren und Pflanzen, insbesondere für die Beseitigung von unerwünschten Zellen in einer geordneten Art und Weise. Während der letzten Jahre ist ein erheblicher Fortschritt bei der Identifizierung und Charakterisierung der modularen Natur von Molekülen, die für die Regulation und Exekution der Apoptose verantwortlich sind, erzielt worden (Aravind et al., 1999, Hofmann, 1999). Von besonderer Bedeutung ist hierbei, dass drei Familien von Homologiedomänen, die Todesdomäne (DD), die Todeseffektordomäne (DED) und die Caspaserekrutierungsdomäne (CARD) existieren, die entfernt miteinander verwandt sind, und eine Superfamilie von „Sechs-Helix-bundle“-Proteininteraktionsdomänen bilden. Bei diesen Domänen ist insbesondere wichtig, dass sie hochspezifische Wechselwirkung mit Mitgliedern der gleichen Subfamilie ausüben und in den meisten Fällen auch eine Rolle beim Signaltransduktionsprozess, der zur



Apoptose und/oder Entzündung führt, spielen. Im Besonderen ist zu beachten, dass die „Adaptorebene“ von Proteinen, die nämlich die Todesrezeptorsignale zu den Caspasen transportieren, stark mit Proteinen besetzt ist, die Kombinationen von Domänen von DD/DED/CARD aufweisen. Aufgrund der großen Bedeutung und der Vorhersagbarkeit ihrer Funktion sind mehrere systematische Suchen nach neuen Proteinen, die diese Domänen enthalten, erfolgreich durchgeführt worden. Hierdurch wurde die Entdeckung von Proteinen wie FLIP, CARDIAK/RIP2, ARC, Bcl10, DEDD (Irmeler et al., 1997; Koseki et al., 1998; McCarthy et al., 1998; Stegh et al., 1998, Thome et al., 1999) möglich. Im folgenden berichten wir von der Entdeckung einer neuen Domänenart, die im folgenden PYD (Pyrindomäne) genannt wird. Diese kann als vierte Subfamilie innerhalb der „Sechs-Helix-„bundle“-Interaktionsdomänen“ bezeichnet werden, nämlich aufgrund von Sequenzhomologien, Strukturvorhersage und Interaktionseigenschaften.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### Identifizierung einer neuen Domäne: Die Pyrin-Domäne

Im Zuge der Analyse der Sequenz des kürzlich identifizierten Proteins Pycard mit einer CARD-Domäne (PYD und CARD enthaltendes Protein), das auch als ASC („Apoptose-assoziiertes Speckle-ähnliches Protein“) bekannt ist, wurde realisiert, dass die zweite strukturelle Domäne, die am N-Terminus von Pycard (Pyrindomäne, PYD) auftritt, eine schwache, aber signifikante Sequenzhomologie zu einer Vielzahl anderer Proteine (Figur 1A) aufweist. Pycard ist ein 22-kDa-Protein, das Aggregate bildet, sobald die Apoptose durch gewisse Antitumorsubstanzen induziert wird (Masumoto et al., 1999).

Darüber hinaus ist festzustellen, dass bei Zellen, die dazu gezwungen wurden, reduzierte Mengen von Pycard zu exprimieren, die Etoposid-vermittelte Apoptose gleichfalls signifikant unterdrückt ist. Unter Verwendung von PYD von Pycard ergab eine einfache BLAST-Suche, dass zwei zusätzliche PYD-enthaltende Proteine in der Sequenzdatenbank enthalten sind, nämlich Pyrin und Caspy. Pyrin wurde anfänglich als Produkt des MEFV (Mittelmeerfieber)-Gens identifiziert, das bei Patienten mit familiärem Mittelmeerfieber mutiert ist (FrenchFMFConsortium, 1997;

InternationalFMFConsortium, 1997), ein erbliches periodisches Fiebersyndrom, das durch episodisches Fieber und serosale und synoviale Entzündung charakterisiert ist. Der Erkenntnisstand im Hinblick auf Pyrin basiert im wesentlichen auf seiner Domänenstruktur, die, zusätzlich zur PYD-Domäne, auch einen B-Box-Zinkfinger und eine „Spry“-Domäne aufweist (Figur 1B). Es wurde daher vorgeschlagen, dass Pyrin ein Mitglied der RoRet-Genfamilie der nukleären Transkriptionsfaktoren ist, was Anlaß zur Spekulation gab, dass das Protein als ein transkriptionaler Inflamationsregulator (Centola et al., 1998) fungiert. Neuere Ergebnisse legen jedoch nahe, dass Pyrin in Zytoplasma lokalisiert ist und keine nachweisbare transkriptionale Aktivität aufweist (Chen et al., 2000; Tidow et al., 2000). Daher ist die genaue Funktion von Pyrin bei inflammatorischen Krankheiten immer noch ungeklärt.

Auf der Basis der PYD-Sequenz dieser beiden Proteine wurde ein allgemeines PYD-Profil erstellt (Bucher et al., 1996) und in den nachfolgenden Suchschritten in der EST-Datenbank eingesetzt. Zwei zusätzliche PYD-enhaltende Proteine NALP1 und NALP2 (NACHT; LRR und PYD-enhaltende Proteine) wurden identifiziert. Die Sequenzanalyse ergab, dass die NALPs eine PYD-, NACHT- und LRR-modulare Organisation aufweisen (Figur 1A, B). Die NACHT- und LRR-Domänenarchitektur wird bei Proteinen aufgefunden, die an der Inflammation oder Apoptose beteiligt sind, insbesondere bei CARD4/Nod1 (Figur 1B), ein NF- $\kappa$ B-induzierendes Molekül (Bertin et al., 1999; Inohara et al., 1999), einem neuronalen Apoptose-Inhibitor-Protein, NAIP, und dem MHC Klasse II-Transkriptionsaktivator, CIITA (Koonin und Aravind, 2000). Interessanterweise ist die Domäne PYD von NALP2 durch CARD bei CARD4/Nod1 ausgetauscht, während die strukturelle Gesamtorganisation konserviert ist, was eine ähnliche Funktionalität vermuten lässt (Figur 1B). CASPY ist ein PYD- und Caspasedomäne enthaltendes Protein, das anfänglich mit einer Datenbanksuche nach Zebrafisch-Homologen von Apoptoseregulatoren von Säugern (Inohara und Nunez, 2000) identifiziert wurde. Diese Caspase ist am stärksten homolog zur Caspase-13, die beim Menschen CARD anstelle von PYD enthält. Beachtenswert ist, dass die gleiche Untersuchung ein Pycard-verwandtes Protein bei Zebrafischen identifiziert hat, was eine hohe evolutionäre Konservierung dieser Proteine indiziert (Figur 1A).

### Die Pyrin-Domäne ist verwandt mit der DD-Familie

Auf der Basis von Sequenzvergleichen wurde vorgeschlagen, dass die Domänen DD, DED und CARD strukturell verwandte Protein-Proteininteraktionsmodule darstellen (Hofmann et al., 1997). Alle drei Domänenarten haben eine ähnliche Größe und die Sekundärstruktur-analyse ergab eine ähnliche Anordnung der sechs  $\alpha$ -Helices. Alle drei Domänen teilen also die Eigenschaft, Homo- oder Heterodimere bilden zu können, und sind außerdem hochkonserviert (Hofmann et al., 1997). Die Strukturvorhersage wurde später durch NMR-Analyse der DDs, DEDs und CARDS (Chou et al., 1998; Eberstadt et al., 1998; Huang et al., 1996; Zhou et al., 1999) bestätigt, da die strukturelle Topologie dieser Domänen sich als sehr ähnlich erwies, insbesondere im Hinblick auf den strukturellen Kern, der durch die Helices  $\alpha 2$  bis  $\alpha 5$  gebildet wird (Figur 2). Einschließlich der PYD-enthaltenden Sequenzen in einem allgemeinen „Alignment“ gegenüber DED, CARD und DD, wurde erfindungsgemäß die PYD-Domäne als ein potentiell viertes Glied der „DD-gefalteten“ Superfamilie identifiziert (Figur 2).

Trotz der Ähnlichkeit ihrer Faltung ist bekannt, dass DD, DED und CARD ausschließlich, mit Mitgliedern der eigenen Subfamilie interagieren, so dass keine Promiskuität zwischen den Domänen festgestellt werden konnte. Um zu überprüfen, ob die PYDs die gleichen Eigenschaften aufweisen, wurden Expressionsvektoren für die PYD-Proteine erzeugt, und in Ko-Immunopräzipitationsexperimenten auf ihre Eigenschaft, mit anderen Proteinen zu interagieren, getestet. Wie in Figur 3 dargestellt, wurde eine spezifische Bindung von Pycard mit den PYDs von Pycard und NALP1 detektiert, wenn eine Koexpression mit einem VSV-markierten Pycard, Flag-markierten Konstrukten enthaltend die PYD von Pycard oder die PYD von NALP1 ausgeführt wurde. Keine Interaktionen der PYD von Pycard mit anderen PYDs oder mit DDs, CARDS oder DEDs (Figur 3) wurden nachgewiesen. Daher ist die PYD-Domäne eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne, die spezifisch mit PYD-Domänen interagiert.

30

Pycard mit seiner PYD-CARD zweigeteilten Domänenorganisation erinnert an das DD und DED enthaltende Molekül FADD oder das DD und CARD enthaltende Protein RAIDD. Für beide Proteine ist bekannt, dass sie ein DD enthaltendes Protein mit einem

- eine DED- oder CARD-Domäne enthaltenden Protein adaptieren. Beispielsweise erfordert die DD von Fas FADD, um an die DED von Caspase-8 zu binden. Unsere Resultate lassen vermuten, dass Pycard ein neues Adaptormolekül darstellt, das NALP1 an ein noch unbekanntes und zu definierendes CARD-enthaltendes Protein koppelt. Tatsächlich zeigen erste Resultate, dass die CARD von Caspase-5 die Zielstruktur von Pycard-CARD ist. Die physiologische Rolle dieser Interaktion wird zur Zeit noch untersucht.
- 10 Zusammenfassend ist festzustellen, dass wir PYD als ein neues Protein-Protein-Interaktionsmodul identifiziert haben, das alle Kriterien eines Mitglieds der DD-Faltungsfamilie erfüllt. Vergleichbar zur beschränkten Interaktions-Fähigkeit, die für andere Mitglieder gilt, interagieren PYDs nur mit PYDs und nicht mit Mitgliedern der drei anderen Subfamilien. Darüber hinaus werden PYDs im Zusammenhang mit Proteinen, die an der Apoptose und der Inflammation beteiligt sind, gefunden, was am besten durch die Caspase Caspy belegt ist. Regelmäßig treten PYDs zusammen mit CARDS, wie z.B. bei NALP1 und Pycard, auf. Die Identifizierung der neuen, PYD-enthaltenden Proteine ermöglicht daher wahrscheinlich die Charakterisierung von neuen pro-apoptotischen oder pro-inflammatorischen Signaltransduktionswegen, wie es auch der Fall war nach der Identifizierung der DD von Fas vor einigen Jahren (Itoh und Nagata, 1993). Wir glauben, dass die Charakterisierung von NALP1 und dem Pycard-Komplex bereits der erste Schritt in diese Richtung ist, was schließlich zu einem besseren Verständnis der molekularen Ursachen von inflammatorischen Krankheiten führen wird.

25

## METHODEN

### Sequenz- und Strukturanalyse

- 30 Die Blast- und Profile-Algorithmen wurden verwendet (Bucher et al., 1996), die auf dem ISREC-Server ([www.isrec.isb-sib.ch](http://www.isrec.isb-sib.ch)) verfügbar sind. Die Sekundärstruktur wurde nach den Algorithmen von Rost und Sander (1993) vorhergesagt.

### Klonierung, Expression und Immunopräzipitation

Pycard-Konstrukte wurden durch PCR aus den folgenden IMAGE EST-Klonen  
5 amplifiziert:

AA528254 (965955) und AI148558 (1714818). Pycard wurde amplifiziert mit den  
folgenden Primern: JT1509 5'-ATGGGCGCGCGCGCGAC-3' und JT1512 5'-  
TCAGCTCCGCTCCAGG-3'. Die PYD-Domäne von Pycard wurde amplifiziert mit  
10 JT1509 und JT1510 5'-CGACTGAGGAGGGGCC-3'.

NALP1-Konstrukte wurden amplifiziert durch PCR unter Verwendung des KIAA0926  
EST-Klons aus dem Kazusa DNA Forschungsinstitut als „Template“. NALP1-PYD  
wurde amplifiziert mit JT1497 5'-  
15 ATGGCTGGCGGAGCCTGGGGCCGCCTGGCCTGTTACTTG-3' und JT1525 5'-  
GATCCAGGGCATTAGCAC-3', NALP1-CARD wurde amplifiziert mit JT1500 5'-  
GTTGATACTTCAGCTGCTGAGTGGCAGGAG-3' und JT1527 5'-  
GATGAGACTCTGGTGTGG-3'.

20 Amplifizierte Schnitt-Fragmente wurden in PCR-Zero-Blunt (Invitrogen) ligiert und  
anschließend in die EcoR1-Schnittstelle von VSV oder Flag-enthaltenden PCR-3  
(Invitrogen) abgeleiteten Vektoren (Thome et al., 1999) subkloniert. Andere  
Konstrukte, die verwendet wurden, entsprachen jenen, die bereits zuvor beschrieben  
worden sind (Thome et al., 1999) subkloniert.

25

Die Immunopräzipitierung wurde, wie zuvor beschrieben (Burns et al., 1998),  
durchgeführt. Kurz zusammengefasst, 293 T-Zellen wurden in DMEM-Medium, das  
mit 10%igem fötalen Kälberserumglutamin angereichert war, kultiviert, in einem  
Bereich von  $1-3 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm-Platte ausgesetzt und mit 3 µg der indizierten  
30 Konstrukte am nächsten Tag durch die Kalziumphosphat-Präzipitationsmethode  
transfiziert. Die Zellen wurden geerntet und in Lysepuffer lysiert (0,2% NP40, 150 mM  
NaCl, 50 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7,4) 24-26 Stunden nach der Transfektion. Die  
Zell-Lysate wurden für mindestens 3 Stunden auf Sepharose 6B (Pharmacia)

vorgereinigt, und zwar vor der Fällung von einer gleichen Menge von Proteinen bei 4°C für vier Stunden mit 3 µl von Flag-Agarose (Kodak International Biotechnology) und 3 µl von Sepharose 6B-Perlen. Das Resin wurde 6x in Lysepuffer gewaschen und nach  
5 dem letzten Waschschrift wurden die gebundenen Proteine durch Kochen in Probenpuffer eluiert, durch SDS-Page separiert und auf Nitrocellulose (Hybond ECL, Pharmacia) für das nachfolgende Western-Blotting transferiert. Sowohl Anti-VSV- und Anti-Flag-Antikörper wurden von Sigma gekauft. Ein HRP-konjugierter Antikörper, der  
10 spezifisch die schwere Kette von IgG1 der Maus (Southern Biotechnology Associates) detektieren konnte, wurde eingesetzt.

## Referenzen

- Aravind, L., Dixit, V.M. and Koonin, E.V. (1999) The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *TIBS*, 24, 47-53.
- Bertin, J., Nir, W.J., Fischer, C.M., Tayber, O.V., Errada, P.R., Grant, J.R., Keilty, J.J., Gosselin, M.L., Robison, K.E., Wong, G.H., Glucksmann, M.A. and DiStefano, P.S. (1999) Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.*, 274, 12955-8.
- Bucher, P., Karplus, K., Moeri, N. and Hofmann, K. (1996) A flexible search technique based on generalized profiles. *Computer Chem.*, 20, 3-24.
- Burns, K., Martinon, F., Esslinger, C., Pahl, H., Schneider, P., Bodmer, J.L., Di Marco, F., French, L. and Tschopp, J. (1998) MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J. Biol. Chem.*, 273, 12203-12209.
- Centola, M., Aksentijevich, I. and Kastner, D.L. (1998) The hereditary periodic fever syndromes: molecular analysis of a new family of inflammatory diseases. *Hum. Mol. Genet.*, 7, 1581-8.
- Chen, X., Bykhovskaya, Y., Tidow, N., Hamon, M., Bercovitz, Z., Spirina, O. and Fischel-Ghodsian, N. (2000) The familial mediterranean fever protein interacts and colocalizes with a putative Golgi transporter. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 224, 32-40.
- Chou, J.J., Matsuo, H., Duan, H. and Wagner, G. (1998) Solution structure of the RAIDD CARD and model for CARD/CARD interaction in caspase-2 and caspase-9 recruitment. *Cell*, 94, 171-80.

Eberstadt, M., Huang, B., Chen, Z., Meadows, R.P., Ng, S.C., Zheng, L., Lenardo, M.J. and Fesik, S.W. (1998) NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. *Nature*, 392, 941-5.

FrenchFMFConsortium. (1997) A candidate gene for familial Mediterranean fever. The French FMF Consortium. *Nat. Genet.*, 17, 25-31.

Hofmann, K. (1999) The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 55, 1113-28.

Hofmann, K., Bucher, P. and Tschopp, J. (1997) The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem. Sci.*, 22, 155-156.

Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P. and Fesik, S.W. (1996) NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature*, 384, 638-41.

Inohara, N., Koseki, T., del Peso, L., Hu, Y., Yee, C., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Liu, D., Ni, J. and Nunez, G. (1999) Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J. Biol. Chem.*, 274, 14560-7.

Inohara, N. and Nunez, G. (2000) Genes with homology to mammalian apoptosis regulators identified in zebrafish. *Cell Death Differ*, 7, 509-10.

InternationalFMFConsortium. (1997) Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. The International FMF Consortium. *Cell*, 90, 797-807.

Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., St inner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E. and



- Tschopp, J. (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388, 190-195.
- Itoh, N. and Nagata, S. (1993) A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.*, 268, 10932-7.
- Koonin, E.V. and Aravind, L. (2000) The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *TIBS*, 25, 223-4.
- Koseki, T., Inohara, N., Chen, S. and Nunez, G. (1998) ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 5156-60.
- Masumoto, J., Taniguchi, S., Ayukawa, K., Sarvotham, H., Kishino, T., Niikawa, N., Hidaka, E., Katsuyama, T., Higuchi, T. and Sagara, J. (1999) ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J. Biol. Chem.*, 274, 33835-8.
- McCarthy, J.V., Ni, J. and Dixit, V.M. (1998) RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J. Biol. Chem.*, 273, 16968-16975.
- Rost, B. and Sander, C. (1993) Secondary structure prediction of all-helical proteins in two states. *Protein Eng.*, 6, 831-6.
- Stegh, A.H., Schickling, O., Ehret, A., Scaffidi, C., Peterhansel, C., Hofmann, T.G., Grummt, I., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1998) DEDD, a novel death effector domain-containing protein, targeted to the nucleolus. *EMBO J.*, 17, 5974-86.

Thome, M., Martinon, F., Hofmann, K., Rubio, V., Steiner, V., Schneider, P.,

Mattmann, C. and Tschopp, J. (1999) Equine herpesvirus-2 E10 gene product, but not its cellular homologue, activates NF-kappaB transcription factor and c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.*, 274, 9962-8.

Tidow, N., Chen, X., Muller, C., Kawano, S., Gombart, A.F., Fischel-Ghodsian, N. and Koeffler, H.P. (2000) Hematopoietic-specific expression of MEFV, the gene mutated in familial Mediterranean fever, and subcellular localization of its corresponding protein, pyrin. *Blood*, 95, 1451-5.

Zhou, P., Chou, J., Olea, R.S., Yuan, J. and Wagner, G. (1999) Solution structure of Apaf-1 CARD and its interaction with caspase-9 CARD: a structural basis for specific adaptor/caspase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 11265-70.

**FIGURLEGENDEN**

**Fig. 5 (A)** Multiple Ausrichtung (Alignment) der Pyrin-Domäne. Position mit mehr als  
5 50% identischen oder ähnlichen Aminosäuren sind auf schwarzem bzw. grauem  
Hintergrund dargestellt. Die Speziesabkürzung ist wie folgt: HS, Homo sapiens und  
DR, Danio rerio. Genebank/EMBL Zugangsnummern sind: AF310103 für humanes  
Pycard, AF310104 für murines Pycard, O15553 für Pyrin, AF310105 für NALP1;  
AF310106 für NALP2, AAF66964 für Zebrafisch CASPY, AAF66956 für Zebrafisch  
10 Pycard. (B) Domänenstruktur der Proteine, die eine Pyrin-Domäne enthalten.  
Homologie-Domänen werden wie folgt benannt: PYD für Pyrin-Domäne, CARD für  
Caspase Recruitment Domain; NACHT für NAIP, CIITA, HET-E und TP1-Domäne;  
LRR für Leucine-Rich Repeats, SPRY für Domäne beim SPlA und Ryanodine-  
Rezeptor. B für B-Box. (C) Aminosäuresequenz von NALP1. Die verschiedenen  
15 Schattierungen der Boxen entsprechen den Domänen wie in Figur 1B (4B) gezeigt.

**Fig. 6** Ausrichtung der repräsentativen Pyrin-Domänen (PYD), Todeseffektordomänen  
(DED), Caspaserekrutierungsdomänen (CARD) und Todesdomänen (DD); diese zeigt  
die Ähnlichkeit dieser Interaktionsdomänen.  $\alpha$ -Linien indizieren die vorhergesagten  $\alpha$ -  
20 Helices für PYD (Rost und Sander, 1993) und die indizierten  $\alpha$ -Helices bei den DD-,  
CARD-, bzw. DED-Lösungsstrukturen (Eberstadt et al., 1998; Huang et al., 1996; Zhou  
et al., 1999)

**Fig. 4** Pycard homodimerisiert mit Hilfe seiner PYD und interagiert mit PYD von  
25 NALP1. Flag-markierte Konstrukte enthalten: PYD von Pycard (Pycard-PYD), RAIDD,  
CARD von Apaf-1 (Apaf1-CARD), PYD von NALP1 (NALP1-PYD), CARD von  
NALP1 (NALP1-CARD) und ein leerer Vektor (Mock-Vektor) wurden in 293 T-Zellen  
mit einem VSV-markierten Pycard-Konstrukt-kotransfiziert. Die Zellen wurden 24  
Stunden nach Transfektion lysiert und die Anti-Flag-Immunopräzipitate wurden im  
30 Hinblick auf die Gegenwart von einem VSV-Pycard analysiert. Die Expression der  
verschiedenen Konstrukte wurde in den Zell-Lysaten (untere Darstellung) analysiert.

## Ansprüche

5

1. DNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein Protein mit mindestens einer PYD-Domäne codiert, einschließlich aller funktionshomologen Derivate, Fragmente oder Allele.  
10
2. DNA-Sequenz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sich ein Signifikanzniveau von  $p < 10^{-2}$  ergibt, wenn die PYD-Domäne der DNA-Sequenz mit einem Suchprofil nach Figur 3 verglichen wird.  
15
3. DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß deren Genprodukt eine der Aminosäuresequenzen (für eine PYD-Domäne), wie in Figur 6 wiedergegeben, einschließlich aller funktionshomologen Derivate, Allele oder Fragmente, enthält.  
20
4. DNA-Sequenz nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine der in Figur 1 angegebenen (c)DNA-Sequenzen enthält.  
25
5. DNA-Sequenz nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß deren Genprodukt eine der in Figur 1 angegebenen Aminosäuresequenzen enthält.  
30
6. Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß er eine DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5 enthält.  
35

- 5 7. Wirtszelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einem Expressionsvektor nach Anspruch 6 transformiert ist.
8. Wirtszelle nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Säugetierzelle, insbesondere eine humane Zelle, ist.
- 10 9. Aufgereinigtes Genprodukt, dadurch gekennzeichnet, daß es durch eine DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5 codiert wird.
- 15 10. Aufgereinigtes Genprodukt nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Polypeptid ist.
- 20 11. Aufgereinigtes Genprodukt nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß es eine der in Figur 7 angegebenen Aminosäuresequenzen (für eine PYD-Domäne), einschließlich aller funktionshomologen Allele, Fragmente oder Derivate enthält.
- 25 12. Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Epitop auf einem Genprodukt nach einem der Ansprüche 9 bis 11 erkennt.
- 30 13. Antikörper nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß er monoklonal ist.
- 35 14. Antikörper nach einem der Ansprüche 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß er gegen einen Sequenzabschnitt auf der PYD-Domäne als Epitop gerichtet ist.

15. Verfahren zur Isolierung von Genprodukten mit mindestens einer PYD-Domäne, dadurch gekennzeichnet, daß Wirtszellen nach Anspruch 7 oder 8 unter geeigneten, die Expression fördernden Bedingungen kultiviert werden und das Genprodukt schließlich aus der Kultur aufgereinigt wird.
16. Verfahren zur Expression von Genprodukten mit mindestens einer PYD-Domäne, dadurch gekennzeichnet, daß Wirtszellen mit einem Expressionsvektor nach Anspruch 6 transformiert werden.
17. Verwendung einer DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder eines Genprodukts nach einem der Ansprüche 9 bis 11 zur Behandlung von Erkrankungen, die auf fehlgesteuerter intrazellulärer Signaltransduktion beruhen.
18. Verwendung einer DNA-Sequenz oder eines Genprodukts nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Erkrankung um eine solche mit einer überschießenden Entzündungsreaktion handelt.
19. Verwendung einer DNA-Sequenz oder eines Genprodukts nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Erkrankung um Psoriasis, Artherosklerose, bakterielle oder virale Infektionserkrankungen, insbesondere bakterielle oder virale Meningitis oder bakterielle Pneumonie, multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Asthma, Sarkoidose, glomeruläre Nephritis oder Osteoarthritis handelt.
20. Verbindung, dadurch gekennzeichnet, daß sie die spezifische Interaktion von PYD-Domänen zur intrazellulären Signalweiterleitung blockiert.

21. Verbindung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet,  
daß sie eine organisch-chemische Verbindung mit  
einem Molekulargewicht von vorzugsweise < 3000 ist.
- 5
22. Verbindung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet,  
daß sie die Zellmembran durch Diffusion oder über  
membranöse Transportproteine passiert.
- 10
23. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 20 oder 21  
zur Behandlung von (bzw. zur Herstellung eines  
Arneimittels zur Behandlung von) Psoriasis,  
Artheriosklerose, bakterielle oder virale  
15 Infektionserkrankungen, insbesondere bakterielle  
oder virale Meningitis oder bakterielle Pneumonie,  
multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Asthma,  
Sarkoidose, glomeruläre Nephritis oder  
Osteoarthritis.
- 20
- 25

Fig. 1

1.1

.....

>Pyc.hs  
 MGTKREAILKVLLENLTPEELKKFKMKLGTVPPLREGFERIPRGALGQLD  
 IVDLTDKLVASYEDYAAELVVAVLDRDMRMLEEAARLQRAA

>Pyc.cdna  
 AGGAAAGGTAGGACCTGATGGCTCCAGGCCCTCGGAGGCTCAGAGGCGCAG  
 GGCTGAGCCATGGGAACGAAGCGCGAGGCCATCCTGAAGGTGCTGGAGAAC  
 CTGACACCGGAGGAGCTCAAGAAGTTCAAGATGAAGCTGGGGACGGTGCCG  
 CTGCGCGAGGGCTTCGGGCGCATCCCGCGGGGCGCGCTCGGGCAGCTAGATA  
 TCGTGGACCTCACCGACAAGCTGGTTCGCCTCCTACTACGAGGACTACGCAGC  
 CGAGCTCGTCGTGGCCGTGCTGCGCGACATGCGCATGTTGGAGGAGGCCGCA  
 CGGCTGCAGCGGGCTGCGTGAGGGCCACTCTGAGCTGGAGGCGGGTCAAGG  
 CAAAAGGAGTAATGCAACGCCTGTGAAGCCAGCCCCACGCGCGCACCAGTC  
 GCGTAAGACAACAGCAGTGTCTCCACCTCGGGGACCAAGGACGCCTCCGTGC  
 CTCCAGACCCCGCCTCCTCCAGCCCCTGCACCTGTCAATTTATTCTTCCACTGCC  
 CAATAAATATTCATGGCAGACTTTAAAAAAAAAA

1.2

>Pyrin  
 MAKTPSDHLLSTLEELVPYDFEFKFKLQNTSVQKEHSRIPRSQIQRARPVKMATLLVTTYGEEYAVQLT  
 LQVLRRAINQRLLAELHRAAIQEYSTQENGTTDDSAASSSLGENKPRSLKTPDHPEGNEGNGPREYGGGAA  
 SLRCSQPEAGRGLSRKPLSKRREKASEGLDAQKPRTRSPALPGGRSPGPCRALEGGQAEVRLRRNASSA  
 GRLQGLAGGAPGQKECRPFVYLPSEGKMRPRSLEVTTSTGEKAPANPEIILLTLEEKTAANLDSATEPRAR  
 PTPDGGASADLKEGPGNPEHSVTGRPPDTAASPRCHAQEGDPVDGTCVRDSCSFPEAVSGHPQASGSRSP  
 GCPRCQDSHERKSPGSLSPQPLPQCKRHLKQVQLLFCEHDDEPILICSLSQEHQGHVRPTEEVVALEHK  
 KKIQKQLEHLKKLRKSGEEQSRSYGEEKAVSFLKQTEALKQVRQKLEQVYVYFLEQQEHFFVASLEDVGM  
 VGQIRKAYDTRVSQDIALLDALIGELEAKECQSEWELLQDIGDILHRAKTVFPVEKWTTPQEIQKQQLL  
 HQKSEFVEKSTKYFSETLRSEMEMFNVPFELIGAQAHAVNVILDAETAYPNLIFSDDLKSVRLGNKWERLP  
 DGPQRFDSCLIVLGSFSLSGRRYWEVEVGDKTAWILGACKTISRKGNMTLSPENGYWVIMMKENEYQ  
 ASSVPPTRLLIKEPPKRVGIFVDYRVGSI SFYNVTARSHIYTFASCFSFSGPLQPIFSPGTRDGGKNTAPL  
 TICPVGGQGP

>Pyrin.cdna  
 GGAAGCCAGACAGCTGGCTCGAGCCTCTCCTGCTCAGCACCATGGCTAAGACCCCTAGTGACCATCTGCT  
 GTCCACCTTGGAGGAGCTGGTGCCCTATGACTTCGAGAAGTTCAAGTTCAAGCTGCAGAACACCAGTGTG  
 CAGAAGGAGCACTCCAGGATCCCCCGGAGCCAGATCCAGAGAGCCAGGCCGCTGAAGATGGCCACTCTGC  
 TGGTCACTACTATGGGGAAGAGTACGCCGTGCAGCTCACCTGCAGGTCTCGCGGGCCATCAACCAGCG  
 CCTGTGCGCGAGGAGCTCCACAGGGCAGCCATTGAGGAATATTCACACAAGAAAACGGCAGAGATGAT  
 TCCGAGCGTCCAGCTCCCTGGGGGAGAACAGCCAGGAGCCTGAAGACTCCAGACACCCCGAGGGGA  
 ACGAGGGGAACGGCCCTCGGCCGTACGGGGCGGAGCTGCCAGCCTGCGGTGCAGCCAGCCCGAGGCCGG  
 GAGGGGGCTGTGAGGAAGCCCTGAGCAAACGCAGAGAGAAGGCCTCGGAGGGCCTGGACGCGCAGGGC  
 AAGCCTCGGACCCCGAGCCCGGCCCTGCGGGCGGAGAGCCCGGCCCTGAGGGCGCTAGAGGGGG  
 GCCAGGCCGAGGTCCGGCTGCGCAGAAACGCCAGCTCCGCGGGGAGGCTGCAGGGCTGGCGGGGGCGC  
 CCCGGGGCAGAAGGAGTGCAGGCCCTTCGAAGTGTACCTGCCCTCGGGAAGATGCGACCTAGAAGCCTT  
 GAGGTCAACCATTTCTACAGGGGAGAAGGCCCGCCGCAAATCCAGAAATTTCTCCTGACTTAGAGGAAAAGA  
 CAGCTGCGAATCTGGACTCGGCAACAGAACCCCGGGCAAGGCCCACTCCGGATGGAGGGGCATCTGCGGA  
 CCTGAAGGAAGGCCCTGGAAATCCAGAACATTCGGTACCGGAAGGCCACCAGACA CGGCTCGAGTCCC  
 CGCTGCCACGCCAGGAAGGAGACCCAGTTGACGGTACCTGTGTGCGTGATTCTTCAGCTTCCCGGAGG  
 CAGTTTCTGGGCACCCCGAGCCTCAGGCAGCCGCTCACCTGGCTGCCCGGGTGCCAGGACTCCCATGA  
 AAGGAAGAGCCCGGAAGCCCTAAGCCCCCAGCCCCCTGCCACAGTGTAAAGCGCCACCTGAAGCAGGTCCAG  
 CTGCTCTTCTGTGAGGATACGATGAGCCCATCTGCCTCATCTGCAGTCTGAGTCAGGAGACCAAGGCC  
 ACCGGGTGCGCCCATTTGAGGAGGTGCGCCTGGAACACAAGAAGAAATTGAGAAGCAGCTGGAGCATCT



## Forts. Fig. 1

GAAGAAGCTGAGAAATCAGGGGAGGAGCAGCGATCCTATGGGGAGGAGAAGGCAGTGAGCTTTCTGAAA  
CAAAC TGAAGCGCTGAAGCAGCGGGTGCAGAGGAAGCTGGAGCAGGTGTACTACTTCTTGGAACAGCAGG  
AGCATTTCTTTGTGGCCTCACTGGAGGACGTGGGCCAGATGGTTGGGCAGATCAGGAAGGCATATGACAC  
CCGCGTATCCAGGACATCGCCCTGCTCGATGCGCTGATTGGGGAACTGGAGGCCAAGGAGTGCCAGTCA  
GAATGGGAAC TTTCTGCAGGACATTGGAGACATCTTGACAGGGCTAAGACAGTGCTGTCCCTGAAAAGT  
GGACCACTCCTCAAGAGATAAAACAAAAGATCCAACCTCCACCAGAAAGTCAGAGTTTGTGGAGAAGAG  
CACAAAGTACTTCTCAGAAACCCTGCGTTTCAAAATGGAAATGTTCAATGTTCCAGAGCTGATTGGCGCT  
CAGGCACATGCTGTTAATGTGATTCTGGATGCAGAAACCGCTTACCCCAACCTCATCTTCTCTGATGATC  
TGAAGAGTGT TAGACTTGGAAACAAGTGGGAGAGGCTGCTGATGGCCCGCAAAGATTTGACAGCTGTAT  
CATTGTTCTGGGCTCTCCGAGTTTCTCTCTGGCCCGCGTTACTGGGAGGTGGAGGTTGGAGACAAGACA  
GCATGGATCCTGGGAGCCTGCAAGACATCCATAAGCAGGAAAGGGAACATGACTCTGTGCCAGAGAAATG  
GCTACTGGGTGGTGATAATGATGAAGGAAAATGAGTACCAGGCGTCCAGCGTTCCCCCGACCCGCGCTGCT  
AATAAAGGAGCCTCCCAAGCGTGTGGGCATCTTCGTGGACTACAGAGTTGGAAGCATCTCCTTTTACAAT  
GTGACAGCCAGATCCACATCTATACATTGCGCCAGCTGCTCTTTCTCTGGGCCCTTCAACCTATCTTCA  
GCCCTGGGACACGTGATGGAGGGAAGAACACAGCTCCTCTGACTATCTGTCCAGTGGGTGGTCAGGGGCC  
TGACTGAATGCCCAACACTGCATCTCTCTCTGCTTCTGGCCTTGATCTTGCACTTCAACTCAATAGT  
CAGCGAATGCCGACTAGGTGCTAGCTGCTATGGGAAATGCAAAAATAACAAAATAGTTACTGTGCCACG  
GAGCCTACCCGATTATAGCAGAGGTAAGTTAGGAACGAACATGTTAGTCAATCCGGGTGAAGACATGTAC  
TGATGACACACCATGGATTTT CAGAGGAGGAAGTACGGAGTCGTTGCATAATCCGCCCTGGTGGGTGGCA  
CTCTCAGGTGCTCCTGAACAGAAGATTTGGCCCTCATTTTCCCTCAGAACCCACCGCAAGGATATATGT  
CCCCTTGTTCTCTCTGCTTCTGTCTTGAGGATATGGGAAGCCTAGAGAAACGCAAGCAGATGGAATTTGGG  
ATAGAAGTATTTGTGTACTGGATTAATGAATGATGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACCAATCTTGC  
TCTGTGGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACGATCTCAGCTCACTGCAACCTCCACCTCCCAGGTTCAAGC  
GATTCTCTGCGCTCAGCCTCCTGAGCAGCTGGGATTACAGGTGCGTGCCACCACACAGGCTGGTTTTCT  
TGTATTTT TAGTAGAGACGGGGTTTCAACATGTTAGCCAGGCTGGTCTCGAATCCTGACCTCAGGTGA  
TCCACCCGCTCAGCCTCCCAAGTGTGGGATTACAGGCATGAGCCACTGTGCCCGGCTATGATTTCTT  
TTTTTTTTTTTTTTTGAGACAAAGTTTTGCTCTTGTACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTGAATCTTGG  
CTCACTGCAACCTCCGCTCCAGGTTCAAGAGATTCTCTGCTCAGCCTCCGAAGTAGCTGGGATTAC  
AGGCGCCCGCCACATGCCCCGGCTAATTTTTTGCATTTTTAGTAGACATGAGGTTTCATCATGTTGGCCA  
GGCCGCTCTCAAACCTCTGACCTCAGGTGATGCACCCACCTCAGCCTCCCAAGTGACAGGATTACAGGC  
ATGAGCCACCATGCTGGCCATGATTTCTTAAGAGAATTGACTGGGCCCTCATGAATAAAAAATTAGAAAA

\*\*\*\*\*

1.3

>Pycard  
MGRARDAILDALENLTAEELKKFKLLSVPLREGYGRIPRGALLSMDALDLTDKLVSYFLEYGABELTA  
NVLRDMGLQEMAGQLQAATHQSSGAAPAGIQAPQSAKPLHFIDQHRAALIRVNTNVEWLLDALYGVK  
LTDBQYQAVRAEPTNPSKMRKLFSTPAWNWTKDLLLLQALRESQSYLVEDLERS

>Pycard.cdna  
GTCCAGGTTCCGCCCCGAGCCGACTTCCTCCTGGTGGCGGCTGCAGCGGGGTGAGCGGCGGCAGCGGC  
CGGGGATCCTGGAGCCATGGGGCGCGCGCGACGCCATCCTGGATGCGCTGGAGAACCTGACCGCCGAG  
GAGCTCAAGAAGTTCAAGCTGAAGCTGCTGTGCGTGGCGCTGCGCGAGGGCTACGGCGCGATCCCGCGG  
GCGCGCTGCTGTCCATGGACGCTTGGACCTCACCGACAAGCTGGTCAGCTTCTACCTGGAGACCTACGG  
CGCCGAGCTACCGCTAACGTGCTGCGGACATGGGCCTGCAGGAGATGGCGGGCAGCTGCAGGCGGCC  
ACGCACCAGGGCTCTGGAGCGCGCCAGCTGGGATCAGGCCCTCCTCAGTGGCGAGCCAAGCCAGGCC  
TGCATTTTATAGACACGACCGGGCTGCGCTTATCGCGAGGGTCAAAACGTTGAGTGGCTGCTGGATGC  
TCTGTACCGGAAGGTCTGACGGATGAGCAGTACCAGGCAGTGGCGGGCGAGCCCAACCCAAGCAAG  
ATGCGGAAGCTCTTCAATTTTCAACACGCTTGAAGTGGACCTGCAAGGACTTGCTCCTCCAGGCCCTAA  
GGGAGTCCCAGTCTTACCTGGTGGAGGACCTGGAGCGGAGCTGAGGCTCCTTCCAGCAACACTCCGGTC  
AGCCCCCTGGCAATCCCAACCAATCATCTGATCTTTTATACAAATATACGAAAAGCCAGCTT  
GAAAAA

\*\*\*\*\*

1.4

>NALP1.hs  
MAGGAWGRLACYLEFLKKEELKEFQLLLANKAHSRSSSETPAQPEKTSMEVASYLVAQYGEQRAWDLA  
LHTWEQMGLRSLCAQAQEGAGHSPSPYSPSEPHLGSPSQPTSTAVLMPWIHELPACTQGSERRVLRQL

Forts. Fig. 1

PDTSGRRWREISASHLYQALPSSPDHESPSQESPNAPTSTAVLGSWGSPPQPSLAPREQEAPGTQWPLDE  
 TSGIYYTEIREREREKSEKGRPPWAAVVGTPPQAHSSLOPHHPWEPSVRESLCSTWPKNEDFNQKFTQ  
 LLLLQRPHPRSQDPLVKRSWPDYVEENRGHLIEIRDLFGPLDQEPRIIVILQGAAGIGKSTLARQVKEA  
 WGRGQLYGDRFQHVYFSCRELAQSKVVSALIELIGKDGATPAPIRQILSRPERLLFILDGVDEPGWVLQ  
 EPSSELCLHWSQPQPADALLGSLLGKTLILPEASFLITARTTALQNLIPSLEQARWVEVLGFSESSRKEYF  
 YRYFTDERQAIRAFRLVKSNKELWALCLVPVWSWLACTCLMQMKRKEKLTLSKTTTTLCLHYLAQALQ  
 AQPLGPQLRDLCSLAAEGIWQKTLFSPDDLKRGHLDGAIISTFLKMGILQEHPIPLSYSFTHLCFOEFF  
 AAMSVLEDEKGRGKHSNCIIDLEKTLAYGIHGLFGASTTRFILGLLSDEGEREMENI FHCRLSQGRNL  
 MQWVPSLQLLLQPHSLHCLYETRNKTLFTQVMAHFEEMGMCVETDMELLVCTFCIKFSRHVKLIQLI  
 EGRQHRSTWSPSMVVLFRWVPVTDAYWQILFSVLKVTNRNLKELDLSGNSLSHSAVKSCKTLRRPRCLLE  
 TLRLAGCGLTAEDCKDLAFGLRANQTLTELDLSFNVLMDAGAKHLQRLRQPSCKLQRLQLVSCGLTSDC  
 CQDLASVLSASPSLKELDLQNNLDDVGVRLLCGGLRHPACKLIRLGLDQTTLSDEMRQELRALEQEKFP  
 LLIIFSRKPSVMTPIEGLDTGEMSNSTSSLRQRLGSERAASHVAQANLKLIDVSKI FPIAETAESSPE  
 VVPVELLCVPSASQGDHLTKPLGTDHDFWGPVTPGVATEVVDKEKNLYRVHFPVAGSYRWNTGLCFVVR  
 EAVTVIEIFCVWDQFLGEINPQHSWMVAGPLLDIKAEFGAVEAVHLPHFVALQGGHVDTSIFQVAHFKEE  
 GMLLEKPARVELHHIVLENPSFSPGLVLLKMIHNALRFIPVTSVLLYHRLHPEEVTFLHYLIPSDCSIR  
 KELELCYRSPGEDQLFSEFYVGHLSGIRLQVKDKKDETLLVWEALVKPGDLMPATTLIPACIAVPSPID  
 APQLLHFVDQYREQLIARVTSVEVVDKLHGQVLSQEQYERVLAENTRPSQMRKLSLSQSWDRCKCKDGL  
 YQALKETHPHLIMELWEKGSKKGLLPLSS

&gt;NALP1.cdna

TGGGAGCCAGCAGCCCGGGGCTCCACTCTGGGTTCTGAAAGCCCATTCCTGCTCTGCGGCTCCTCCCA  
 CCCACCTCTTCTCAGCCTTGACGCTCAAGGGTTGATCTCAGGAGTCCAGGACCCAGGAGAGGGAAGAT  
 CTGAGGAACACAGAACAGATGGCTGGCGGAGCCTGGGGCCGCTGGCCTGTTACTTGAGATTCTCGAAG  
 AAGGAGGAGCTGAAGGAGTTCAGCTTCTGCTCGCCAATAAAGCGCACTCCAGGAGCTCTCGGGTGAGA  
 CACCCGCTCAGCCAGAGAAGACGAGTGGCATGGAGGTGGCCTCGTACCTGGTGGCTCAGTATGGGGAGCA  
 GCGGGCTGGGACCTAGCCCTCCATACCTGGGAGCAGATGGGGCTGAGGTCACTGTGCGCCCAAGCCAG  
 GAAGGGGCGAGGCCACTCTCCCTCATTCCCTACAGCCCAAGTGAAACCCACCTGGGGTCTCCAGGCCAAC  
 CCACCTCCACCGCAGTGCTAATGCCCTGGATCCATGAATTGCCGGCGGGGTGCACCCAGGGCTCAGAGAG  
 AAGGGTTTGTAGACAGCTGCCCTGACACATCTGGACCGCTGGAGAGAAATCTCTGCCCTCACACCTCTAC  
 CAAGCTCTTCCAGCTCCCCAGACCATGAGTCTCCAGCCAGGAGTCAACCAACGCCCCCAATCCACAG  
 CAGTGTCTGGGAGCTGGGGATCCCCACCTCAGCCAGCCTAGCACCCAGAGAGCAGGAGGCTCCTGGGAC  
 CCAATGGCCTCTGGATGAACCGTCAGGAATTTACTACAGAAATCAGAGAAAGAGAGAGAGAGAAATCA  
 GAGAAAGGCAGGCCCCCATGGGCAGCGGTGGTAGGAACGCCCCCAAGGCGCACAGCAGCCTACAGCCCC  
 ACCACCACCCATGGGAGCCTTCTGTGAGAGAGAGCCTCTGTTCACATGGCCCTGGAAAAATGAGGATTT  
 TAACCAAAATTCACACAGCTGCTACTTCTACAAGACCTCACCCAGAAAGCAAGATCCCCTGGTCAAG  
 AGAAGCTGGCCCTGATTATGTGGAGAGAAATCGAGGACATTTAATTGAGATCAGAGACTTATTGGCCAG  
 GCCTGGATACCCAGAACCTCGCATAGTCATATCGCAGGGGGCTGCTGGAATTGGGAAGTCAACACTGGC  
 CAGGCAGGTGAAGGAAGCCTGGGGGAGAGGCCAGCTGTATGGGGACCGCTTCAGCATGTCTTCTACTTC  
 AGCTGCAGAGAGCTGGCCAGTCCAAGGTGGTGAATCTCGCTGAGCTCATCGGAAAGATGGGACAGCCA  
 CTCGGCTCCCATTAGACAGATCCTGTCTAGGCCAGAGCGGCTGCTCTTCATCCTCGATGGTGTAGATGA  
 GCCAGGATGGGTCTTGACAGGACCGAGTTCTGAGCTCTGTCTGCACTGGAGCCAGCCACAGCCCGCGGAT  
 GCACTGCTGGGCAGTTTGCTGGGGAAAACTATACCTCCGAGGCATCCTTTCTGATCACGGCTCGGACCA  
 CAGCTCTGCAGAACCTCATTCTTTCTGGAGCAGGCAGCTGGGTGAGAGTCTGGGGTTCTCTGAGTC  
 CAGCAGGAAGGAATATTTCTACAGATATTTACAGATGAAGGCAAGCAATTAGAGCCTTTAGGTTGGTC  
 AAATCAAAACAAAGAGCTCTGGGCCCTGTGTCTGTGCCCTGGGTGTCTGGCTGGCCTGCATCTGCCTGA  
 TGCAGCAGATGAAGCGGAAGGAAAACTCACACTGACTTCCAAGACCAACCAACCTCTGTCTACATTA  
 CCTTGCCAGGCTCTCAAGCTCAGCCATTGGGACCCAGCTCAGAGACCTCTGCTCTCTGGCTGCTGAG  
 GGATCTGGCAAAAAAGACCTTTTCAAGTCCAGATGACCTCAGGAAGCATGGGTAGATGGGGCCATCA  
 TCTCCACCTTCTGAAGATGGGTATTCTTCAAGAGCACCCCATCCCTCTGAGCTACAGCTTCAATTCACCT  
 CTGTTTCCAGGAGTTCTTTGAGCAATGTCTATGTCTTGAGGATGAGAAGGGGAGAGGTAACATTCT  
 AATTGCATCATAGATTGGGAAAAGACGCTAGAAGCATATGGAATACATGGCCTGTTTGGGGCATCAACCA  
 CACGTTTCTATTGGGCCTGTTAAGTGATGAGGGGGAGAGAGAGATGGAGAACATCTTTCACTGCCGGCT  
 GTCTCAGGGGAGGAACCTGATGCAGTGGGTCCCGTCCCTTCAGCTGCTGCTGCAGCCACACTCTCTGGAG  
 TCCCTCCACTGCTTGTATGAGACTCGGAACAAACGTTCTTGACACAGTGATGGCCATTTCTGAGAAA  
 TGGGCATGTGTAGAAACAGACATGGAGCTCTTAGTGTGCACTTTCTGCATTAAATTACAGCCGACCGT  
 GAAGAAGCTTCAAGCTGATTGAGGGCAGGCAGCAGATCAACATGGAGCCCCAGCATGGTAGTCTGTTTC  
 AGGTGGGTCCAGTCACAGATGCCTATTGGCAGATTCTCTCTCGTCTCAAGGTACCAGAAACCTGA

Forts. Fig. 1

AGGAGCTGGACCTAAGTGAAACTCGCTGAGCCACTCTGCAGTGAAGAGTCTTTGTAAGACCCTGAGACG  
 CCCTCGCTGCCTCCTGGAGACCCTGCGGTTGGCTGGCTGGCCCTCACAGCTGAGGACTGTAAGGACCTT  
 GCCTTTGGGCTGAGAGCCAACAGACCCTGACCGAGCTGGACCTGAGCTTCAATGTGCTCATGGATGCTG  
 GAGCCAAACACCTTTGGCCAGAGACTGAGACACCGAGCTGCAAGCTACAGCGACTGCTGAGCTG  
 TGGCCTCACGCTGACTGCTGCCAGGACCTGGCCTCTGTGCTTAGTGCCAGCCCCAGCCTGAAGGAGCTA  
 GACCTGCAGCAGAACAACCTGGATGACGTTGGCGTGCGACTGCTCTGTGAGGGGCTCAGGCATCCTGCCT  
 GCAAACCTCATACGCTGGGCTGGACCAGAGCACTCTGAGTGATGAGATGAGGAGGAGCTGAGGGCCCT  
 GGAGCAGGAGAAGCCTCAGCTGCTCATCTTCAGCAGACGGAAACCAAGTGTGATGACCCCTATTGAGGGC  
 CTGGATACGGGAGAGATGAGTAATAGCACATCCTCACTCAAGCGGAGAGACTCGGATCAGAGAGGGCGG  
 CTTCCCATGTTGCTCAGGCTAATCTCAAACCTCTGGACGTGAGCAAGATCTTCCAATTGCTGAGATTGC  
 AGAGGAAAGCTCCCCAGAGGTAGTACCGGTGGAACCTTTGTGCGTGCCCTCTCCTGCTCTCAAGGGGAC  
 CTGCATACGAAGCCTTTGGGGAAGTACGATGACTTCTGGGGCCCCACGGGGCTGTGGCTACTGAGGTAG  
 TTGACAAAGAAAGAACTTTGTAACGAGTTCACTTCCCTGTAGCTGGCTCCTACCGCTGGCCCCAACAGGG  
 TCTCTGCTTTGTGCTGAGAGAAGCGGTGACCGTTGAGATTGAATCTGTGTGTTGGGACCAAGTCTCTGGGT  
 GAGATCAACCCACAGCACAGCTGGATGTTGGCAGGGCCTCTGCTGACATCAAGCTGAGCCTGGAGCCG  
 TGAAGCTGTGCACTCCCTCACTTTGTGGCTCTCAAGGGGGCCATGTGGACACATCCCTGTTCCAAGT  
 GGCCCACTTTAAAGAGGAGGGGATGCTCCTGGAGAAGCCAGCCAGGGTGGAGCTGCATCACATAGTTCTG  
 GAAAACCCAGCTTTTCCCCCTTGGGAGTCTCTGAAAATGATCCATAATGCCCTGCGCTTCATTCCCG  
 TCACCTCTGTGGTGTGCTTTACACCGCCTCCATCCTGAGGAAGTCACTTCCACCTCTACTGATCCC  
 AAGTGAAGTCTCCATTCCGAAGGAAGTGGAGCTCTGCTATCGAAGCCCTGGAGAAGACCAGCTGTTCTCG  
 GAGTTCTACGTTGGCCACTTGGGATCAGGGATCAGGCTGCAAGTGAAGACAAGAAAGATGAGACTCTGG  
 TGTGGGAGGCTTGGTGAAGAACAGGAGATCTCATGCTGCAACTACTCTGATCCCTCCAGCTGCATAGC  
 CGTACCTTCACTCTGGATGCCCCGAGTTGCTGCACTTTGTGGACCAATGATGAGAGCAGCTGATAGCC  
 CTGGCTGACATCGGTGGAGGTTGTCTTGGACAACTGCAATGGACAGGTGCTGAGCCAGGAGCAGTACGAGA  
 GGGTGTCTGGCTGAGAACAGGAGGCCAGCCAGATGCGGAAGCTGTTCAAGCTTGAGCCAGTCTCTGGGACCG  
 GAAGTGAAGATGGAAGTCTACCAAGCCCTGAAGGAGACCCATCCTCACTCATATGGAAGTCTCTGGGAG  
 AAGGGCAGCAAAAAGGGAAGTCTCTGCCACTCAGCAGCTGAAGTATGAACACCAGCCCTTGACCCCTGAGTC  
 CTGGCTTTGGCTGACCCCTTCTTGGGTCTCAGTTCTTCTCTGCAACCAAGTTGCCATCTGGTTTGCCT  
 TCCAGCACTAAAGTAATGGAACCTTTGATGATGCTTTGTCTGGGCTATGTTGCCATGCCAGGGATGCCA  
 CAGGGGGCCCCAGTCCAGGTGGCCTAACAGCATCTCAGGAATGTCCATCTGGAGCTGGCAAGACCCCTG  
 CAGACCTCATAGAGCCTCATCTGGTGGCCACAGCAGCCAGCCATAGAGCCCTCCGGATCCCATCCAGGGC  
 CAAAGAGGAATAGGAGGACATGGAACCATTTGCCTCTGGCTGTGTACAGGGTGAGCCCCAAAATTTGGG  
 GTTCAGCGTGGGAGGCCACGTGGATTCTTGGCTTTGTACAGGAAGATCTACAGAGCAAGCCCAACAGAGT  
 AAAGTGAAGGAAGTTTATTCAGAAAATAAAGGAGTATCACTGCTCTTTTAGAATTTGTCTAGCAGACTT  
 TCCAGTTTTTACCAGAAAACCCCTATAAATTAAAAATTTTACTTAAATTTAAGAATTAATAAAAAATACA  
 AAAAAGAAAAAATGAAAAATAAGGAATAAGAAGTTAAAAAATAAAAAAATAAAAAA

1.5  
 >NALP2/Py7.hs

MVSSAQMGFNLQALLEQLSQDELSKFYLIITTFSLAHELQKI PHKEVDKADGKQVEILTTHCDSYWVEMA  
 SLQVFKEKMRMDLSEKAKDEVREAAKLSFNKRKPLSLGITRKEPPLDVEMLERFKTEAQFTETKGNVI  
 CLGKEVFGKPKPDKNRCRYILKTKFREMWSWPGDSKEVQVMAERYKMLIPFSNPRVLPFPFSYTVVLVY  
 PAGLGKTTLAQKMLDWAEDNLHKFKYAFYLSCRELSRLGPCSFAELVFRDWPQLDDIPHILAQARKIL  
 FVIDGFDELGAAPGALIEDICGDWEKKKPVFVLLGSLNVRVLPKALLVTRPRALRDLRLIAEPIYIR  
 VEGFLEEDRRAYFLRHFQDEDDQAMRAPELMRSNAALFQLGSAPAVCWIVCTTLKLQMEKGEDFVPTCLTRT  
 GLFLRFLCSRFPQGAQLRGALRTLSELLAAQGLWAQTSVLHREDLERLGVQESDLRLFLDGDILRQDRVSKG  
 CYSFIHLSFQQFLTALFYTLKEKEEEDRDGHTWDIGDVQKLLSGVERLRNPDLIAGYYSFGLANEKRAKE  
 LEATFGCRMSPDIKQELLRCDISCKGGHSTVTDLQELLGCLYESQEEELVKEVMAQFKEISHLNAVDVVP  
 SSFCVKHCRNLQKMSLQVIKENLPENVTASESDAEVERSQDDQHMLPFWTDLCSIFGSNKDLMGLAINDSF  
 LSASLVRILCEQIASDTCHLQRVVFKNI SPADAHRLCLALRGHKTVTYTLTQGNDDQDMFALCEVLRHP  
 ECNRLRYLGLVSCSATTQOWADLSLAEVNQSLTCVNLSDNELLEGAALLYTLRHPKCFQLRLSLENCHL  
 TEANCKDLAAVLVVSRELTHLCLAKNPIGNTVGVKFLCEGLRYPECKLQTLVLWNCIDITSDCGCDLTKLLQE  
 KSSLLCLDLGLNHIGVKMKFLCEALRKPLCNLRCLWLWGCSIIPFSCEDLCSALSCNQSLVTLDLGQNP  
 GSSGVKMLFETLTCSSGTLRLTLRLKIDDFNDELNKLLEIEEKNPQLIIDTEKHPWAERPSSSHDFMI

>NALP2Py7.dna

Forts. Fig. 1

AAAAACTTATTAGAGCTTTCTCAACCTGCAGCCCTCATCTCCGCCGCGAGTAGGGCCAGGTGTTGGGAGC  
 TCCCACGTGGGACAAGATGGTGTCTTCGGCGCAGATGGGCTTCAACCTGCAGGCTCTCTGGAGCAGCTCA  
 GCCAGGATGAGTTGAGCAAGTTCAAGTATCTGATCACGACCTTCTCCCTGGCACACGAGCTCCAGAAGATC  
 CCCACAAAGGAGGTAGACAAGGCTGATGGGAAGCAACTGCTAGAAATCCTCACCACCCATTGTGACAGCTA  
 CTGGGTGGAGATGGCGAGCCTCCAGGTCTTTGAAAAGATGCACCGAATGGATCTGTCTGAGAGAGCAAAGG  
 ATGAAGTCAGAGAAGCAGCTTTGAAATCCTTTAATAAAAAGGAAACCTCTATCATTAGGGATAACACCGAAA  
 GAACGACCACCTCTAGACGTGGACGAAATGCTGGAGCGCTTCAAAACAGAAGCACAGCGTTTACAGAAAC  
 GAAAGGAAATGTCTGCTGGGTAAAGAAGTCTTTAAAGGAAAAAGCCAGACAAAGACAATAGGTGCA  
 GGTATATATTGAAGACGAAGTTCCGGGAGATGTGGAAGAGCTGGCCTGGAGATAGCAAAAGAGGTCCAGGTT  
 ATGGCTGAGAGATACAGATGCTGATCCCATTCAGCAACCCAGGGTGCTTCCGGGGCCCTTCTCATACAC  
 GGTGTGTCTGTATGGTCTTGCAGGCCTTGGGAAAAACACGCTGGCCCGAGAACTAATGTAGACTGGGCAG  
 AGGACAACTCATCCAAAATTCAAATATGCGTTCTACCTCAGCTGCAGGGAGCTCAGCCCGCTGGGCCCG  
 TGCAGTTTTCAGAGCTGGTCTTTCAGGACTGGCCTGAATTGCAGGATGACATTCACACATCCTAGCCCA  
 AGCACGGAATCTTGTTCGTGATTGACGGCTTTGATGAGCTGGGAGCCGACCTGGGGCGCTGATCGAGG  
 ACATCTCGGGGACTGGGAGAAGAAGACCGGTGCCCGTCTCTCGGGAGTTTGCTGAACAGGGTGATG  
 TTACCCAAGGCCCGCTGCTGGTCACACGCGGCCAGGGCCCTGAGGGACCTCCGATCCTGGCGGAGGA  
 GCCGATCTACATAAGGGTGGAGGGCTTCCCTGAGGAGGACAGGAGGGCTTATTTCTTGAGACATTTGGAG  
 ACGAGGACCAAGCCATGCGTGCCTTTGAGCTAATGAGGAGCAACGCGGCCCTGTTCCAGCTGGGCTCGGCC  
 CCCGCGTGTGCTGGATCGTGTGAAGCTCTGAAGCTGCAGATGGAGAAGGGGGAGGACCCGGTCCCCAC  
 CTGCCCTACCCGACCGGGCTGTTCTCGCTTCTCTGAGCCGGTTCGCCGAGGGCGCACAGCTGCGGG  
 GCGCGCTGCGGACGCTGAGCCTCCTGGCCGCGCAGGGCCTGTGGGCGCAGACGTCCTGCTTCAACGAGAG  
 GATCTGGAAAGGCTCGGGGTGCAGGAGTCCGACCTCCGTCTGTTCTCTGACGGAGACATCCTCCGCCAGGA  
 CAGAGTCTCCAAAGGCTGCTACTCCTTCATCCACCTCAGCTTCCAGCAGTTTCTCACTGCCCTGTTCTACA  
 CCCTGGAGAAGGAGGAGGAAGAGGATAGGGACGCCACACTGGGACATTTGGGGACGTACAGAAGCTGCTT  
 TCCGGAGTAGAAAGACTCAGGAACCCGACCTGATCCAAAGCAGGCTACTACTCCTTTGGCCTCGCTAACGA  
 GAAGAGGCAAGGAGTTGGAGGCCACTTTTGGCTGCCGGATGTCAACGGACATCAAACAGGAATGTCTGC  
 GATCGACATAAGTTGTAAAGGGTGGACATTCACGGTGAACAGCTGCAGAGCTCCTCCGCCAGGA  
 GAGTCTCAGGAGGAGGAGCTGGTGAAGGAGGTGATGGCTCAGTTCAAAGAAATATCCCTGCACTTAAATGC  
 AGTAGACGTGTGCCATCTTCATTCTGCGTCAAGCACTGTGAAACCTGCAGAAAATGTCACTGCAGGTAA  
 TAAAGGAGAATCTCCCGAGAATGTCACTGCGTCTGAATCAGACGCCGAGGTTGAGAGATCCAGGATGAT  
 CAGCACATGCTTCTTCTGGAACGACCTTTGTTCCATATTGGATCAAATAAGGATCTGATGGGTCTAGC  
 AATCAATGATAGCTTCTCAGTGCCCTCCCTAGTAAGGATCTGTGTGAACAAATAGCCTCTGACACCTGTC  
 ATCTCCAGAGAGTGGTGTCAAACCATTTCCCAGCTGATGCTCATCGGAACCTCTGCCTAGCTCTTCGA  
 GGTCAACAGACTGTAACTGATCTGACCTTCAAGGCAATGACCAGGATGATATGTTTCCCGATTGTGTGA  
 GGTCTTGAGACATCCAGAATGTAACCTGCGATATCTCGGGTTGGTGTCTTGTTCGGCTACCACTCAGCAGT  
 GGGCTGATCTCTCTTGGCCCTTGAAGTCAACGAGTCCCTGACGTGCGTAAACCTCTCCGACATGAGCTT  
 CTGGATGAGGGTGCTAAGTTGCTGTACACAACCTTGAGACACCCCAAGTGCTTTCTGCAGAGGTTGTCTGT  
 GGAAACTGTCACTTACAGAAGCCAATTGCAAGGACCTTGCTGCTGTGTGTGTTGTGAGCCGGGAGCTGA  
 CACACCTGTGCTTGGCCAAGAACCCCATTTGGGAATACAGGGGTGAAGTTCTGTGTGAGGGCTTGAGGTAC  
 CCCGAGTGTAACCTGCAGACCTTGGTGCTTTGGAAGTGCAGACATAACTAGCGATGGCTGCTGCGATCTCAC  
 AAAGCTTCTCCAAGAAAAATCAAGCCTGTTGTGTTGGATCTGGGGCTGAATCACATAGGAGTTAAGGGAA  
 TGAAGTTCTGTGTGAGGCTTTGAGGAAACCACTGTGCAACTTGAGATGTCTGTGGTTGTGGGGATGTTCC  
 ATCCCTCCGTTTCAAGTGTGAAGACCTCTGCTCTGCCCTCAGCTGCAACAGAGCCTCGTCACTCTGGACCT  
 GGGTCAGAATCCCTTGGGCTCTAGTGAGTGAAGATGCTGTTTGAACCTTGACATGTTCCAGTGGCACCC  
 TCCGGACACTCAGGTTGAAAATAGATGACTTTAATGATGAACTCAATAAGCTGCTGGAAGAAATAGAAGAA  
 AAAACCCACAACCTGATTTATTGATACTGAGAAACATCATCCCTGGGCAGAAAGGCCCTTCTTCTCATGACTT  
 CATGATCTGAATCCCCCGAGTCATTCTCATGAGTCACTGATTTTCCAGGTGTTGGTGAAGTACTGCC  
 TGTGACTCTCTCTCCCCGGCCCCCTACCCCTCAGGGATAATGAGTTCATTGCTGGGCTAGATGTTTATGC  
 CATGATCTGCTCTGTTTATACCTGCACACATCCTTATCTTGTACATATGAAATATCTGTATCACGG  
 GTATATTGAGAGAAATAAAGGTGAGAGCATTCAAAAAA

1.6

&gt;NALP3/PY5.hs

MLRTAGRDGL CRLSTYLEEL EAVELKKFKL YLGTALELGE GKIPWGSMEK AGPLEMAQLL  
 ITHFGPEEAW RLALSTFERI NRKDLWERGQ REDLVRDPQE TYRDYVRRKF RLMEDRNARL  
 GECVNLSHRY TRLLLVKEHS NPMQVQQQLL DTGRGHARTV GHQASPIKIE TLFEPDEERP

Forts. Fig. 1

EPRTVVMQG AAGIGKSMIA HKVMDWADG KLFQGRFDYL FYINCREMNO SATECSMODL  
 IFSCWPEPSA PLOELIRVPE RLLFIIDGFD ELKPSFHDPO GPWCLCWECK RPTELLINSL  
 IRKKLLPELS LLITTRPTAL EKLHRLLEHP RHVEILGFSE AERKEYFYKY FHNAEQAGQV  
 FNVVRDNEPL FTMCFVPLVC WVVTCLQQQ LEGGELLRQT SRTTAVYML YLLSLMQPKP  
 GAPRLQPPPN QRGCLSLAAD GLWNQKILFE EQDLRKHGLD GEDVSAFLNM NIFQKDINCE  
 RYYSFIHLSF QEFFAAMYI LDEGEGGAGP DQDVTRILLTE YAFSERSFLA LTRFLFGLL  
 NEETRSHLEK SLCWKVSPHI KMDLLQWIOS KAQSDGSTLO QGSLEFFSCL YEIQEEFFIQ  
 QALSHFQVIV VSNIAKMEH MVSSFCLKRC RSAQVILHYG ATYSADGEDR ARCSAGATL  
 LVQLRPRTV LLDAYSEHLA AALCTNPNI ELSLYRNALG SRGVKLLCQG LRHPNCKLON  
 LRLKRCRISS SACEDLSAAL IANKNLTRMD LSGNGVGFPG MMLLCEGLRH PQCRLOMIQL  
 RKQLESAC QEMASVLGTN PHLVELDLTG NALEDLGLRL LCQGLRHPVC RLRTLWLKIC  
 RLTAACDEL ASTLSVNQSL REIDLSLNEL GDLGVLLLC E GLRHPTCKLO TLRIGICRLG  
 SAACEGLSV LQANHNRLREL DLSFNLDGDW GLWLLAEGLO HPACRLQKLW LDSCGLTAKA  
 CENLYFTLGI NQTLTDLYLT NNALGDTGVR LLCKRLSHPG CKLRVLWLFQ MDLNMKTHSF  
 PEPLQPDVAV DLYPRQFPAG NRNHLRFSSC RRPSTASVD MGVTDGAQMS QHFPLGHQNS  
 APHLRPTGQL REYVLNLSS

&gt;NALP3/PY5.dna

atgctacgaaccgcagggcagggacggcctctgtcgctgtccacctacttggagaactc  
 gaggtgtggaactgaagaagtcaagttatacctgggaccgcagagactgggagaa  
 ggcaagatcccctgggaagcatggagaaggccggtcccctggaaatggccagctgctc  
 atcacccacttcgggcccagaggaggcctggaggttggtctcagcacctttgagcggata  
 aacagggaaggacctgtgggagagaggacagagagaggacctgggtgaggatccccaggaa  
 acctacagggaactatgtccgcaggaaattccggctcatggaagaccgcaatgcgcgccta  
 ggggaatgtgtcaacctcagccacgggtacacccggctcctgctgggtgaaggagcactca  
 aaccccatcagggtccagcagcagcttctggacacagggcgggacacgcgaggaccgtg  
 ggacacaggctagccccatcaagatagagaccctctttgagccagacgaggagcgcccc  
 gagccaccgcacccgtggtcatgcaaggcgcggcagggataggcaagtcctatgtggca  
 cacaaggtgatgtgtgactgggacgggacgggaagctcttccaaggcagatttgattatctc  
 ttctacatcaactgcaggggagatgaaccagagtgccacggatgcagcatgcaagacctc  
 atcttcagctgtgtgctgagcccgccgctctccaggagctcatccgaggttcccgag  
 cgctcctcttccatcgacggcttcgatgagctcaagcctcttccacgatcctcag  
 ggaccctggtgctctgtgtgggaggagaaacggccacggagctgcttctaacagctta  
 attcggaagaagctgtctccctgagctatcttgtctcatccacacggccacggcttg  
 gagaagctccaccgtctgtgtggagcaccacaggcatgtggagatcctgggcttctctgag  
 gcagaaagggaaggaaacttctacaagtatttccacaatgcagagcagggcgggcgaagtc  
 tccaattacgtgaggggacaacgagcctctcttcacatgtgtcttctccccctggtgtgc  
 tgggtggtgtgtacgtgctccagcagcagctggagggtggggggctgttgagacagacg  
 tccaggaccaccactgcagtgatcatgtctacctgctgagctgtgatgcaacccaagccg  
 ggggccccgcgctccagccccaccacacagagagggttggtgctccttggcgcgagat  
 gggctctggaatcagaaaaatcctatttgaggagcaggacctccggaagcacggcctagac  
 ggggaagacgtctctgccttctcaacatgaacatcttccagaaggacatcaactgtgag  
 aggtactacagcttcatccacttgagtttccaggaattcttggcagctatgtactatctc  
 ctggacgagggggagggcggggacggccagaccagagcgtgaccaggctgttgaccgag  
 tacgctgttctgaaaaggagcttctggcactcaccagcgcttctgtttggactcctg  
 aacgaggagaccaggacacctggagaagagctctctgtggaaggtctcgccgcacatc  
 aagatggacctgtgcagtggtccaaagcaaagctcagagcgacggctccaccctgcag  
 cagggtcctctggagttcttcagctgctgtacgagatccaggaggaggaggttatccag  
 caggccctgagccacttccaggtgatcgtggtcagcaacattgctccaagatggagcac  
 atgggtctcctcgttctgtctgaagcgtgcaggagcgccagggtgctgcaactgtatggc  
 gccacctacagcgggacggggaagaccgcgcgaggtgctccgaggagcgcacacgctg  
 ttggtgcagctcagaccagagaggaccgttctgctggacgctacagtgaaacatctggca  
 gcggccctgtgcaccaatccaaacctgatagagctgtctctgtaccgaaatgccctgggc  
 agccgggggggtgaagctgctctgtcaaggactcagacaccccaactgcaaaactcagaac  
 ctgaggtcgaagaggtgcccgcattctccagctcagcctgcgaggacctctctgcagctctc  
 atagccaataagaatttgacaaggatggatctcagtggaacggcgttggattcccaggc  
 atgatgctgctttgcgagggcctgcggcatccccagtgaggctgcagatgattcagttg  
 aggaagtgctcagctggagtcggggcttctcaggagatggcttctgtgctcggcaccac

Forts. Fig. 1

ccacatctggttgagttggacctgacaggaaatgcactggaggatttgggacctgaggtta  
 ctatgccagggactgaggcaccagctctgcagactacggactttgtggctgaagatctgc  
 cgcctcactgctgctgacctgtgacgagctggcctcaactctcagtgtgaaccagagcctg  
 agagagctggacctgagcctgaatgagctgggggacctcggggtgctgctgctgtgtgag  
 ggctcaggcatccacagtcaagctccagacctgcggttgggcatctgcggctgggc  
 tctgcgcctgtgaggggtcttctgtggtgctccaggccaaccacaacctccgggagctg  
 gacttgagtttcaacgacctgggagactggggcctgtggttgcctggctgaggggctgcaa  
 catccgcctgcagactccagaaactgtggctggatagctgtggcctcacagccaaggct  
 tgtgagaatctttacttcacctggggatcaaccagaccttgaccgacctttacctgacc  
 aacaacgcccctaggggacacaggtgtccgactgctttgcaagcggtgagccatcctggc  
 tgcaaacctccgagtcctctggttatttgggatggacctgaataaaatgaccacagttt  
 ccggagccattacagccagacgtgtgaaggacctgtaccaagacagtttccggctggg  
 aatcgaaaccacaggtctcttagttcctgcagaagaccgagctccacggcatccggtgat  
 atgggctgacccggtgacgctcaaatgtcgagcactttccacttggacatcagaatagt  
 gctccacatttgaggcccacagggccagctgcgggagtagctgctcaacctttctggttaa

\*\*\*\*\*

1.7

&gt;NALP4/PY6.hs

MADSSSSSFFPDFGLLLYLEELNKEELNTFKLFLKETMEPEHGLTPWNEVKARREDLANLMKKYYPGEKA  
 WSVSLKIFGKMNLDLCERAKEBINWSAQITIGPDDAKAGBTQEDQEAVLIVNTGVPNSWATDPYWSAAPR  
 ESGRIAGGDGTEYRNRIKEKFCITWDKSLAGKPEDFHHGLAEKDRKLLLEHLFDVDVKTGAQPQIIVLQGA  
 AGVGKTTTLVRKAMLDWAEGSLYQORFKYVFYLNGREINQLKERSFAQLISKDWPSTEGPIEIMYQPSLL  
 FIIDSFDELNFAPFEEPEFALCEDWTQEHFVSFLMSSLLRKVMLPEASLLVTRLTTSKRLKQLLKNHXYVE  
 LLGMSDAREEYIYQFFEDKRWAMKVFSSLSKNEMLFSMCQVPLVCWAACTCLKQOMEKGGDVTLTCQTTT  
 ALFTCYISSLFTFVDGSGSPSLPNQAQLRRLCQVAAGIWTMTYVFYRENLRRLGLTQSDVSSFMDSNIIQK  
 DAHEYENCYVFTLHVQEFFAAMFYMLKGSWEAGNPSCQPFEDLKSLLQSTSYKDPHLTQMKCFLFGLLNED  
 RVKQLERTFNCKMSLKI KSKLLQCMFVLGNSDYSQSLGFLFELFHCLYETQDKAFISQAMRCFPKVAINIC  
 EKIHLLVSSFCCLKRCRLRTIRLSVTTVFEKKILKTSLPNTNWEWMGNRAIGQIRPLECPEEDFLVDCAH  
 GGAALDALAFPKYTYFYSENTIL

&gt;NALP4/Py6.dna

ATGGCAGATTTCATCATCATCTTCTTTCTTCTCTGATTTTGGGCTGCTATTGTATTGAGGAGCTAAACAA  
 AGAGGAATTAATAACATTCAAGTTATTCTTAAGGAGACCATGGAACCTGAGCATGGCCTGACACCCTGGA  
 ATGAAGTGAAGAAGCCAGGCGGGAGGACCTGGCCAAATTGATGAAGAAATATTATCCAGGAGAGAAAGCC  
 TGGAGTGTGTCTCTCAAAATCTTTGGCAAGATGAACCTGAAGGATCTGTGTGAGAGAGCGAAAGAAGAGAT  
 CAACTGGTGGGCCAGACTATAGGACCAGATGATGCCAAGGCTGGAGAGACACAAGAAGATCAGGAGGCAG  
 TGCTGGTTCATAGTTAAACACAGGGGTCCCAACTCCTGGGCCACAGACCCCTACTGGTGGCGGGCCCTCGG  
 GAATCAGGTGCGCATAGCAGGAGGTGATGGAACAGAATACAGAAATAGAATAAAGGAAAAATTTGCATCAC  
 TTGGGACAAGAAGTCTTTGGCTGGAAAGCCTGAAGATTTCCATCATGGAATTGCAGAGAAAGATAGAAAAC  
 TGTGGAAACACTTGTTCGATGTGGATGTCAAAAACGGGTGCACAGCCACAGATCGTGGTGTTCAGGGAGCT  
 GCTGGAGTTGGGAAAAACAACCTTGGTGAGAAAGGCAATGTTAGATTGGGCAGAGGGCAGTCTCTACCAGCA  
 GAGGTTTAAAGTATGTTTTTTATCTCAATGGGAGAGAAATTAACCAGCTGAAAGAGAGAAAGCTTTGCTCAAT  
 TGATATCAAAGGACTGGCCCGACACAGAAGGCCCATTTGAAGAAATCATGTACCAGCCAAGTAGCCTCTTG  
 TTTATTATTGACAGTTTCGATGAACTGAACTTTGCTTTGAAGAACCTGAGTTTGCAGTGTGCGAAGACTG  
 GACCCAAGAAACACCCAGTGTCTTCTCATGAGTAGTTTGTGAGGAAAGTGTGCTCCTTGAGGCATCCT  
 TATTGGTGACAACAAGACTCACAACTTCTAAGAGACTAAAGCAGTTGTTGAAGAATCACCATTATGTAGAG  
 CTACTAGGAATGTCTGAGGATGCAAGAGAGGAGTATATTTACCAGTTTGTGAAGATAAGAGGTGGGCCAT  
 GAAAGTATTCACTTCACTAAAAAGCAATGAGATGCTGTTTAGCATGTGCCAAGTCCCCCTAGTGTGCTGGG  
 CCGCTTGTACTTGTCTGAAGCAGCAATGGAGAAGGGTGGTGTGTCACATTGACCTGCCAAAACAACCACA  
 GCTCTGTTTACCTGTCTATATTTCTAGCTTGTTCACACCAGTAGATGGAGGCTCTCCTAGTCTACCCAACCA  
 AGCCAGCTGAGAAGACTGTGCCAAGTCTGCTGCCAAAGCAATATGGACTATGACTTACGTGTTTTACAGAG  
 AAAATCTCAGAAGGCTTGGGTTAACTCAATCTGATGTCTTAGTTTTATGGACAGCAATATTATTAGAAAG  
 GACGCAGAGTATGAAAACCTGTATGTGTTACCCACCTTCATGTTTACGAGTTTGTGAGCTATGTTCTA  
 TATGTTGAAGGCAGTTGGGAAGCTGGGAACCCCTTCCGCCAGCCTTTTGAAGATTTGAAGTCATTACTTC  
 AAAGCACAAAGTTATAAAGACCCCATTTGACACAGATGAAGTGTCTTTTGTGTTGGCCTTTGAATGAAGAT  
 CGAGTAAACAACTGGAGAGGACTTTTAACTGTAAATGTCACTGAAGATAAAATCAAAGTTACTTCAGTG

Forts. Fig. 1

TATGGAAGTATTAGGAAACAGTGACTATTCTCCATCACAGCTGGGATTTCCTGGAGTTGTTTTCACTGTCTGT  
 ATGAGACTCAAGATAAAGCGTTTATAAGCCAGGCAATGAGATGTTTCCCAAAGGTTGCCATTAAATTTGT  
 GAGAAAAATACATTTGCTTGTATCTTCTTTCTGCCCTTAAGCACTGCCGGTGTGTCGGGACCATCAGGCTGTC  
 TGTAACTGTGTTATTTGAGAAGAAGATATTAAAAACAAGCCTCCCACTAACACTTGGGAGTGGATGGGAA  
 ACGGGAGAGCTATTGGACAAATAAGACCTCTGGAGTGGCCAGAGGAAGACTTCTCTGGTGGACTGTGCCAC  
 GGTGGAGCTGCACTGGATGCTCTTGCCTTCCAAAGTACACTTACTTTTACTCCAATACTATCTCTGA

1.8

>NALP5/Py8.hs (contiens py12)  
 MSDVNPPSDT PIPFSSSSSTH SSHIPPWTF SYPGSPCENG VMLYMRNVSH BELQRFKQLL  
 LTELSTGTMP ITWDQVETAS WAEVVHLLIE RFPGRRAWDV TSNI FAIMNC DKMCVVVRE  
 INAILPTLEP EDLNVGETQV NLEEGESGKI RRYKSNVMEK FFPINDITW PGNQDFFYQ  
 GVHRHEEYLP CLLLPKRPQG RQPKTVAIQG APGIGKTLA KKVMFEWARN KFYAHKRWCA  
 FYFHCQEVNQ TTDQSFSELI EQKWPQSQDL VSKIMSKPDQ LLLLLLDGFEE LTSTLIDRLE  
 DLSEDWRQKL PGSVLLSSLL SKTMLPEATL LIMIRFTSWQ TCKPLKCP S LVTLPGFNTM  
 EKIKYFQMYF GHTTEGDQVL SFAMENTILF SMCRVVVCW MCVSGLKQOM ERGNLTLQSC  
 PNATSVFVRY ISSLFPTRAE NFSRKIHQAQ LEGLCHLAAD SMWHRKWVLG KEDLEEALED  
 QTGVTAFLGM SILRRIAGEE DHYVFTLVTF QEFFAALFYV LCFPQRLKNF HVLSHVNIQR  
 LIASPRGSKS YLSHMGFLFLF GFINEACASA VEQSFQCKVS FGNKRKLLKV IPLLHKCDPP  
 SPGSGVPQLF YCLHEIREEA FVSQALNDYH KVVLRIGNNK EVQVSAFCLK RCQYLHEVEL  
 TVITLNFNVW KLSSSSSHPGS DLRRVNSTML NQDLIGVLTG NQHLRYLEIQ HVEVESKAVK  
 LLCRVLRSPR CRLQCLRLD CLATPRIWTD LGNNLQGNH LKTLILRKN S LENC GAYYLS  
 VAQLERLSQS KMLTHLSLAE NALKDEGAH IWNALPHLRC PLQRLVLRKC DLTFNCCQDM  
 ISALCKNKTL KSLDLFSNLS KDDGVILLCE ALKNPDCTLO ILELENCLEFT STCCQAMASM  
 LRKNQHLRHL DLSKNAIGVY GILTLCEAFS SQKREBVF TIHNSQDLEA PKCPSTDEWI  
 KKMWYLRTME YYSAMKKLK CRNNGIETA HWCSGPTCSI LPKNPLFPQN LSSQPCIKME  
 GDKSLTFSSY GLOWCLYELD KEFQTFKEL LKKSSSEST CSIPQFEIEN ANVECLALL  
 HEYVGASLAW ATSI SIFENM NLRTLSEKAR DDMKRHSPED PEATMTDQGP SKEKVPGISQ  
 AVQQDSATAA ETKEQEISQA MEQEGATAAE TEEQEISQAM EQEGATAAET EQQHGDDTW  
 DYKSHVMKTF ABEEDVRRSF ENTAADWPEN QTLAGAFDSD RWGFRPRTVV LHGKSGIGKS  
 ALARRIVLCW AQGGLYQGMF SYVFFLPVRE MQRKKESSVT EFISREWPS QAPVTEIMSR  
 PERLLFIIDG FDDLGSVLNN DTKLCKDWA E KQPPFTLIRS LLRKVLLPES FLIVTVRDVG  
 TEKLESEVVS PRYLLVRGIS GEQRIHLLLE RGIGEHQKTQ GLRAIMNRE LLDQCVPAV  
 GSLLICVALQL QDVVGESVAP FNQTLTGLHA AFVHQLTFR GVVRRCINLE ERVVLKRFER  
 MAVEGVWNRK SVFDGDDLMV QGLGESELRA LFHMNILLPD SHCEEYTFH HLSLQDFCAA  
 LYYVLEGLEI EPALCPLYVE KTKRSMELKQ AGFHIHSLWM KRFLFGLVSE DRRPLEVLL  
 GCPVPLGVKQ KLLHWVSLG QQP NATTPGD TLD AFHCLFE TDQKEFVRLA LNSFQEVWLP  
 INQNLDLIAS SFCLQHCPYL RKIRVDVKG I FPRDESABAC PVVPLWMDK TLIEEQWEDF  
 CSMLGTHPHL RQLDLGSSIL TERAMKTLCA KLRHPTCKIQ TLMFRNAQIT PGVQHLWRIV  
 MANRNLRLSLN LGGTHLKEED VRMACRALKH PKCLLESRL DCCGLTHACY LKISQILTS  
 PSLKSLSLAG NKVTDQGVMP LSDALRVSQC ALQKLILED C GITATGCQSL ASALVSNRSL  
 THLCLSNNSL GNEGVNLLCR SMRLPHCSLQ RLMLNQCHLD TAGCGFLALA LMGNLWTLHL  
 SLSMNFVEDN GVKLLCEVMR EPSCHLQDLE LVKCHLTAAC CESLSCVISR SRHLKSLDLT  
 DNALGDGGVA ALCEGLKQKN SVLTRLGLKA CGLTSDCCEA LSLALSCNRH LSLNLVQNN  
 FSPKGMKLC SAFACPTSNL QIIGNDSEEN DVLRESALVV LKVTVSKNL SMTLRENLLY  
 LPKPYNTTRH RDSEEGIHGW TERLWKQYP VQIRKLEEV QLLKPRVVID GSWHSFDEDD  
 RLDLQSQNS HSARQTYNLM ASQKSDPINP ATFRDLRSTA DGGTGHFHI G VPPVGCVRFS  
 DVPAPTCQVR DEVGILVHNS QKVQTHVSI SR

>NALP5/Py8.dna |GENSCAN\_predicted\_CDS\_1|6939\_bp  
 atgagtgaacgtgaatccaccctctgacacccccattcccttttcactcctccactcac  
 agttctcatattccgccctggacattctcttctaccccggtcccatgtgaaatggg  
 gtcattgctgtacatgagaacgtgagccatgaggagctacaacggttcaagcagctctta  
 ctgactgagctcagtactggcaccatgccatcacctgggaccaggtcgagacagccagc  
 tgggcagaggtggttcattctcttgatagagcgtttccctggacgacgcgcttgggatgtg  
 acttcgaacatcttggcattatgaactgtgataaaatgtgtgtgtgtagtccgcagagag  
 ataaatgccattctgcctaccttggaaaccagaggactgaatgtgggagaaacacaggtg  
 aatctggaggaaggagaatctggtaaaatacggcggtataaatcgaatgtgatggaaaag

Forts. Fig. 1

tttttcccatatgggacattacgacttggcctggaaaccagagggacttcttctaccaa  
ggtgtacacagggcagaggtacttaccatgtctgttctgcccacaaagacccagggg  
agacagcccaagaccgtggccatcacagggagctcctgggatcggaacaaatcctggcc  
aaaaaggtgatgtttgagtgggcccagaaacaagtctacgcccacaagcgctggtgtgt  
ttctacttccattgccaagaggtgaaccagacgacagaccagagcttctccgagctgatt  
gagcaaaagtggcctggatctcaggacctcgtgtcaaagattatgtccaaaccgaccaa  
cttctgtgtctcttggatggctttgaggagctcacatctaccctcattgacagactggag  
gacctgagtgaagactggaggcagaaattgcctgggtctgtcctactgagcagtttgtgt  
agcaaaacgatgtctccagaggccacgctactgatcatgataagatttacctcttggcag  
acatgcaagcccttgtgaaatgtccctctctcgttaacccttccgggggttaatacgtg  
gaaaaaatcaagtatttccagatgtattttggacacacagaggaggagaccaagtcttg  
agtttcgcatggaaaaacaccattctcttctccatgtgcgggtccctgtggtttgtgtg  
atggtctgtctgtgtctgaaacagcaaatggagagaggaaacaatctcacacagctcatgt  
ccaaatgccacctctgtgttcgtccggtatatttctagcttgtttcccaccagagctgag  
aacttttccagaaagatccaccaagcacaaactggaaggtctgtgtcacttggccgagac  
agcatgtggcagagaaatgggtgttaggttaagaagatcttgaggagcgaagctggat  
cagacgggagtcacccgcttccctggcatgagtattcttcggagaattgcagggtgaggaa  
gaccactatgtctttaccctcgtgacttttcaggaattttttgccccttgttttatgtt  
ctctgtttccacaaagactcaaaaaatttcatgtgttgagccacgtgaatatccagcgc  
ctgatagcaggtcccagaggaagcaaaagctatctctctcacatgggacttttcttattc  
gggttttctgaacgagggcctgcgcttcggccgtggaacagtcattccaaagcaaggtgtct  
tctcggttaataagaggaaactgctgaaagtcatacctctgttgataaaatgtgaccacct  
tctccgggagtcggggtcccgagttattctactgtctgcatgaaatccgggaggaagcc  
tttgtaagccaagccctaaatgattatcataaagtgtcttgagaattggcaacaacaaa  
gaagtccaagtgtctgtttttgcctgaagcgggtgtcaatatttgcatgaggtggaactg  
accgtaccctgaacttcatgaacgtgtggaagctcagctccagctcccatcctggctct  
gacctaaaggcgtgtgaatagcaccatgttgaaccaggacttaatcggtgttttgacgggg  
aaccagcatctgagatacttggaaatacaacatgtggaagtggagtcctaaagctgtgaag  
cttctatgcagggtgtgagatccccccggtgcccgtctgcaggtgtctcaggttggagac  
tgcttggccacccctagaatttggactgatcttggcaataatcttcaaggtaacgggcat  
ctaaagactctcactaagaaaaaactccctggagaactgtggggcgattacctgtct  
gtggcccagctggagaggctgtcgcagagtaagatgtgacccacctgagcttggcagaa  
aacgccttgaagatgaaggggccaagcatatttggaaatgccctgccacacctgagatgt  
cctctgcagaggctggtactgagaaagtgtgacttgaccttaattgtgtcaggatag  
atctctgcgtctgtaaaaataaaacccctgaaaagtcttgacctaaagttttaataagctg  
aaggatgtaggggtgatcctgtgtgtgaggccctgaagaacctgactgtacattacag  
atcctggagctggaaaaactgcctgttccctccatctgtgtccagggccatggcttccatg  
ctccgcaaaaaccaacatctgagacatctggacttgagcaagaatgcgattggagctcat  
ggtattctgacctgtgtgcaggcccttctcaagccaaaagaagagagaagaggtcatttcc  
actattcacaatagccaagatttggaaagcacctaagtgtccatcaacagatgaatggata  
aagaaaatgtggtacttacgcacaatggagtactattcagccatgaaaaagaaacttaag  
tgtagaacaatgggtatcatagaacagcacactggtgtcaggtcctacttgctctata  
ttaccaagaatccacttttcccccaaacctgagctctcagccttgtatcaagatggaa  
ggagacaaatcgctcaccttttccagctacgggctgcaatgggtgtctctatgagctagac  
aaggaagaatttccagacattcaaggaattactaaagaagaaatcttcagaatcgaccaca  
tgctctatttccacagtttgaatcgagaatgccaacgtggaatgtctggcactcctcttg  
catgagtattatggagcatcgctggcctgggtacgtccattagcatctttgaaaacatg  
aacctgcgaacctctcggagaaggcacgggatgacatgaaaagacattcaccagaagat  
cctgaagcaacgatgactgaccaaggaccaagcaaggaaaaagtgcagggaatttcacaa  
gctgtgcaacaagatagtgccacagctgcagagacaaaaagaacaagaatttcacaagct  
atggaacaagaaggtgccacagcagcagagacagaagaacaagaatttcacaagctatg  
gaacaagaaggtgccacagcagcagagacagaagaacaaggacatggaggtgacacatgg  
gactacaagagtcacgtgatgaccaaatctcgtgaggaggaggatgtacgtcgtagtttt  
gaaaacactgctgtgactggccggaaatgcaaacgttggctgggtgtctttgattcagac  
cgggtggggcttccggcctcgacgggtgttctgcacggaaagttaggaattgggaatcg  
gctctagccagaaggatcgtgtgtgtgtggcgcaaggtggactctaccagggaaatgttc  
tctacgtcttcttccctccgttagagagatgcagcgggaagaaggagagcaggtgtcaca  
gagttcatctccaggaggtggccagactcccaggctccgggtgacggagatcatgtcccga



Forts. Fig. 1

ccagaaaggctgttgttcatcattgacgggttctgatgacctgggctctgtcctcaacaat  
gacacaaagctctgcaaagactgggctgagaagcagcctccgttcaccctcatacgcagt  
ctgctgaggaaggctcctgctccctgagtccttctgatcgtcaccgtcagagacgtgggc  
acagagaagctcaagtcagaggtcggtgtctcccggttacctgttagttagaggaatctcc  
ggggaacaaagaatccacttgcctctgagcggggattgggtgagcatcagaagacacaa  
gggttgcgtgcatcatgaacaaccgtgagctgctcgaccagtgccaggtgcccgccgtg  
ggctctctcatctgcgtggccctgcagctgcaggacgtgggtggggagagcgtcgcccc  
ttcaaccaaacgctcacaggcctgcacgcgcgttttgtgttcatcagctcaccctcga  
ggcgtggtccggcgtgtctcaatctggaggaaagattgtcctgaagcgttctgcccgt  
atggctgtggagggtgtggaataggaagtcagtggttgcgggtgacgacctcatggtt  
caaggactcggggagctctgagctccgtgctctgtttcacatgaacatccttctcccagac  
agccactgtgaggagtactacaccttcttccacctcagctctccaggacttctgtgccgct  
ttgtactacgtgttagagggcctggaaatcgagccagctctctgccctctgtacgttgag  
aagacaaagaggtccatggagcttaaacaggcaggcttccatattccactcgcttggatg  
aagcgtttcttgtttggcctcgtgagcgaagcgttaaggaggccactggaggtcctgctg  
ggctgtcccgttcccctgggggtgaagcagaagcttctgcactgggtctctctgttgggt  
cagcagcctaattgccaccacccaggagacacctggacgccttccactgtctttcgag  
actcaagacaaagagtttgttgccttggcattaaacagcttccaagaagtgtggcttccg  
attaaccagaacctggacttgatagcatcttcttctgctccagcactgtccgtatttg  
cggaaaattcgggtggatgtcaaagggatcttcccaagagatgagtcgctgagggatgt  
cctgtggtccctctatggatgcgggataagacctcattgaggagcagtgaggagatttc  
tgcctcatgcttggcaccacccacacctgcggcagctggacctgggcagcagcatcctg  
acagagcggggcctgaagacctgtgtgccaagctgaggcatcccacctgcaagatacag  
acctgtatgttttagaaatgcacagattaccctgggtgtgcagcacctctggagaatcgtc  
atggccaacctgaacctaatgctccctcaacttgggaggcaccacctgaaggaagaggat  
gtaaggatggcgtgtgaagccttaaacacccaaaatgtttgttggagctctttagggctg  
gattgtgtggattgacctatgctgttacctgaagatctcccaaatccttacgacctcc  
cccagctgaaatctctgagcctggcaggaaacaaggtgacagaccaggaggtaatgctc  
ctcagtgatgccttgagagctctccagtgccgcttcagaagctgatactggaggactgt  
ggcatcacagccacgggttgccagagctctggcctcagccctcgtcagcaaccggagcttg  
acacacctgtgcctatccaacaacagcctggggaacgaaggtgtaaatctactgtgtcga  
tccatgaggcttccccactgtagtctgcagaggctgtatgctgaatcagtgccacctggac  
acggctggctgtggtttcttgcacttgcgcttatgggtaactcatggctgacgcacctg  
agccttagcatgaacctgtggaagacaatggcgtgaagcttctgtgagaggtcatgaga  
gaacctcttgtcatctccaggacctggagttggtaagtgatcatctcaccgcccgtgctg  
tgtgagagctctgtcctgtgtgactctcgaggagcagacacctgaagagcctggatctcacg  
gacaaatgccctgggtgacgggtgggttgcctgcactgtgaggggactgaagcaaaagac  
agtggtctgacagagactcgggttgaaggcatgtggactgacttctgatgtgtgaggca  
ctctccttggcccttctctgcaaccggcatctgaccagctctaaacctgggtgcagaataac  
ttcagtcctcaaggaatgatgaagctgtgttggccttggcctgtcccacgtctaaactta  
cagataatggcaatgactctgaagaaaatgacgttcttgcagaatctgctctagtgtt  
ttgcttaaagtcactgtttccaagaacctatcaatgacattaaaggagagaacttactgtac  
ctcccaaacctataacacgacccggcacagagactctgagggaaggaattcatggatgg  
actgaaaggctgtggaatggcagtagcctgtgcaataaggaagctgctggagggaagtg  
cagctactcaagccccgagtcgtaattgacggttagttggcattcttcttgatgaagatgac  
cgattggatcttcaaagccagcaaacagtcactcagcaagacagacttacaatctcatg  
gcatcacagaagtcagatcccatcaacctgccacattccgttggatagaagcactgtct  
gacgtggggaccggccacttccacatcggggtcccgcctgtgggtgttaggtgttcagt  
gacgtccctgcttttacctgccaggtaagagatgaagtaggtatccttgttcacaacagc  
caaaagggtgcagacaaaccacgtgtctatcagcagatga

1.9

&gt;NALP6/PY9

MDQPEAPCSSTGPRLAVARELLLALEELSQEQLKRFHKLKRDVGPDRSIPWGRLEERADAVDLAEQLAQF  
YGPEPALEVARKTLKRADARDVAAQLQERRIQLGLGSGTLLSVSEYKKKYREHVLQLHARVKERNARSVK

Forts. Fig. 1

ITKRFTKLLIAPESAAPBEALGPAREPEPRARRSDTHTFNRLFRDEEGRRPLTVVLQGPAGIGKTMMAK  
 KILYDWAAGKLYQGQVDFAFFMPCGELLERPGTRSLADLILDQCPRGAPVPQMLAQPQRLFLDGADEL  
 PALGGPEAAPCTDPFEAASGARVLGGLLSKALLPTALLVTTTRAAAPGRLOGRILCS PQCAEVRGFSKDKK  
 KYFYKFFRDERRAERAYRFVKENETLFCVFPVVCWIVCTVLRQQLLELGRDLRTSKTTTSVYLLFTSV  
 LSSAPVADGPRLOQDLRNLCLAREGVLGRRRAQFAEKELEQLERGSKVQTLFLSKKELPGVLETEVTYQF  
 IDQSFQEFLLAALSYLLEDGGVPRTAAGGVGTLRGRDAQPHSHLVLTTRFLFGLLSAERMRIERHFGCMVS  
 ERVQKEALRWVQGGQCGCPGVAPEVTEGAKLEDTERPEEEEEEGEENYPLELLYCLYETQEDAFVRQALC  
 RFPELALQVRVFCRMDVAVLSYCVRCPPAGQALRLISCLVAAQEKKKSLGKRLQASLGGGSLWLTQALP  
 EVFPRPPCCDICPTPPDPRLQKAFARVPLNIAPIQPLPRGLASVERMNVTVLAGAGPGDPKTHAMTDP  
 LCHLSLTLSSHCKLPDAVCRDLSEALRAAPALTELGLLHNLSEAGLRMLSEGLAWPQCVRVQTVRVQLPDP  
 QRGQLYLVGMLRQSPALTTLDLSCQLPAPMVTYLCVAVLQHQGGLQTLSSLSPSDPTPSSFSGRCREPGR  
 RLGLSRWRPSAPPEPSGDSEARTQVEAAGGAGGRRRGREPPARGPHQPPRDAARGPGSSFAHSGRFVQG  
 TPGPRTRPTRLPLPAGTEGSRGRGRESTSRPRARPSDRPRRPGTAPASQRPPEGSGRGPRTFLVARQPGSS  
 FLPALAWSRGTVPTLAPGDRVGLRPLRPSSMEDAGEDPTTFAHSLPSDPRLLATVTNAYLGRVHDT  
 LHVSGVYNGAGDTHRAMLPSPLNVRLEAPAGMGELTETFALDTNTGSFLEHTEGPRFRASQCTYAHRTL  
 PHVLAFRVSIARLAPGSGPITLLLSAFSPESPDLDLHQGPDFQGARYLYGHTLTPEQPGGPQOEVMHWT  
 PAPDLTLGEGEARTWDFLTAVGGSQAQAQACLTALQLQARGALYTAHAQAWAQLWVECCLDVVGPLQL  
 RQALRGSLYLLSALPQPKAPGYICHGLSPGGLSNGSREECYWGHVFWDDQDLWMFPSILMFHPEAARALE  
 YRIRTLGALENAQNLGYQAKFAWESADSGLEVCPEDIYGVQEVHVGAVVLAFLYHYHTQDLQLFREA  
 GGWDVVRVAVAEFWCSRVEWSPREEKYHLRGVMSPDEYHSGVNNSVYTNVLVQNSLRFAAALAQDLGLPIPS  
 QWLAVADKIKVFPDVEQNFHPEFDGYEPDPRVCPGTPSSQRHLFVGEVVKQADVLLGYVPFSLSPDVR  
 KNLEIYEAVTSEPGPAMTWSMFAVGWMLKDAVRARGLLDRSFANMAEPFKVWTENADGSGAVNFLTGMGG  
 FLQAVVFGCTGFRVTRAGVTDFPVCLSGISRVSVSGIFYQGNKLNFSFSEDSVTVEVTARAGPWAPHLEAE  
 LWPQSRLSLPLGHKVSFPRASAGRIQMSPPKLPSSSSSEFPGRTFSDVRDPLQSPPLWVTLGSSSPTESLTV  
 DPASE

&gt;NALP6/PY9.dna

ATGACACAGCCAGAGGCCCTGCTCCAGCACGGGGCCGCGCTCGCGGTGGCCCGGAGCTGCTCCTGGC.  
 TGGCTGGAGGAACTGAGCCAAGAGCAGCTGAAGCGCTTCGCCACAAGCTGCGGACGCTGGGCCCGGACG  
 GACCCAGCATCCCGTGGGGCGGCTGGAGCGCGCGGACGCGCTGGACCTCGCGGAGCAGCTGGCCCACTTC.  
 TACGGCCCGGAGCCTGCGCTGGAGGTGGCCCGCAAGACCCTCAAGAGGGCGGACGCGCGGACGCTGGCGGC  
 GCAGCTCCAGGAGCGGCGCTGCGAGCGCTCGGGCTCGGCTCGGGACGCTGCTCTCCGTGTCCGAGTACA  
 AGAAGAAGTACCGGGAGCAGTGCTGCGAGCTGCAAGCTCGGGTGAAGGAGAGGAACGCCCGCTCCGTGAAG  
 ATCACCAGCGCTTCACCAAGCTGCTCATCGGCGGAGAGCGCGCCCGGAGGAGGCGCTGGGGCCCGG  
 GGAGAGCCTGAGCCGGGGCGCGCGCGCTCGGACACGACACTTTCACCGCCTCTTCGCGCGGACG  
 AGGAGGGCCGCGCGCGCTGACCGTGGTGTGCGAGGGCCCGCGGCGCATCGGCAAGACCATGGCGGCCAAA  
 AAGATCCTGTACGACTGGCGCGCGGCAAGCTGTACAGGGCCAGGTGGACTTCGCCCTCTTCATGCCCTG  
 CGGCGAGCTGTGAGAGGGCCGGGACGCGCAGCCTGGCTGACCTGATCCTGGACAGTGCCCGGACCGCG  
 GCGCGCGGTGCCGAGATGCTGGCCGAGCCGAGCGGCTGCTCTTCATCCTGGACGGCGCGGACGAGCTG  
 CGGCGCTGGGGGGCCCGAGGCGCGCGCTGCAAGACCCCTTCGAGGCGCGGAGCGCGCGCGGTGCT  
 AGGCGGGCTGTGAGCAAGGCGCTGCTGCCACGCGCCTCTGCTGGTGACACGCGCGCGCGCGCGCGG  
 GGAGGCTGCGAGGCGCGCTGTGTTCGCCGAGTGCGCGAGGTGCGCGGCTTCTCGACAAGGACAGAAG  
 AAGTATTTCTACAAGTTCTTCGGGATGAGAGGAGGGCCGAGCGCGCTACCGCTTCGTGAAGGAGAAGA  
 GACGCTGTTTCGCGCTGTGCTTCGTGCCCTTCGTGTGCTGGATCGTGTGCACCGTGTGCGCGCAGCTGG  
 AGCTCGGTGCGGACCTGTGCGCACGTCCAAGACCACCAAGTCACTGTGCTTTTCATCACCAGCGTT  
 CTGAGCTCGGCTCCGCTAGCCGACGGGCCCGGTTGCGAGGGCGACCTGCGCAATCTGTGCGCGCTGGCCCG  
 CGAGGGCGTCTCGGACCGAGGGCGCAGTTTCCGAGAAGGAACCTGGAGCAACTGGAGCTTCGTGGCTCCA  
 AAGTGACAGACGCTGTTTCTCAGCAAAAAGGAGCTGCGGGCGTGTGAGAGACAGAGGTACCTACGAGTTT  
 ATCGACAGAGCTTCAGGAGTTCTCGCGGACTGTCTACTCTGCTGGAGGACGGCGGGGTCGCCAGGAC  
 CGCGGCTGGCGGCTTGGGACACTCCTGCGTGGGGACGCCAGCGCACAGCCACTTGGTGTCTACCAAGC  
 GCTTCCTCTTCGAGCTGTGAGCGCGGAGCGGATGCGGACATCGAGCGCCACTTCGGCTGTCATGTTTCA  
 GAGCGTGTGAAGCAGGAGGCCCTGCGGTGGTGTGAGGACAGGACAGGGCTGCCCCGGAGTGGCACCAGA  
 GGTGACCGAGGGGGCCAAAGGGCTGAGGACACCGAAGAGCCAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG  
 ACTACCCACTGGAGTTGCTGTACTGCTGTACGAGACGCGAGGAGGACGCGTTTGTGCGCCGAAGCCCTGTG  
 CGGTTCCCGAGCTGGCGCTGCGAGGAGTGGCTTCTGCGCATGGACGTGGCTGTTCTGAGCTACTGCGT  
 GAGGTGCTGCCCTGCTGACAGGCACTGCGGCTGATCAGCTGCAGATTGTTGTGCTGCGCAGGAGAGAAGA  
 AGAAGAGCCTGGGGAAGCGGCTCCAGGCCAGCCTGGGTGGCGGAGCTGGCTGGGGACCCAACTGGCTCCA

Forts. Fig. 1

GAAGTACCTTTTCGACCACCTTGCTGTGACATCTGCCCCACACCTCCACCAGACCTCGGCTCCTCCAGGG  
CAAGGCTTTTGCCAGAGTTCCTTTGAATATAGCTCCAATTCAGCCCCTGCCAGGGGCTTGGCATCTGTTG  
AGAGGATGAATGT CACGGTGT TGGCAGGGGCTGGGCTGGGGACCCAAAGACCCATGCAATGACTGACCCA  
CTGTGCCATCTGAGCAGCCTCAGCTGTCCACTGCAAACTCCCTGACGCGGTCTGCGAGACCTTTCTGA  
GGCCCTGAGGGCAGCCCCGCACTGACGGAGCTGGGCTCCTCCACAACAGGCTCAGTGAGGCAGGACTGC  
GTATGCTGAGTGAGGGCCTAGCCTGGCCGCACTGAGGGTGACAGCGGTACAGCTGCCTGACCCC  
CAGCGAGGGCTCCAGTACCTGGTGGGTATGCTTCGGCAGAGCCCTGCCCTGACCACTGGATCTCAGCGG  
CTGCCAACTGCCCCGCCCATGGTGACCTACCTGTGTGAGTCTTCAGCACACAGGGATGCGGCCTGCAGA  
CCCTCAGCCTCTCGCTTCTTCTGACCCGACCCGAGTTCCTTCTCCGACCGGTGTCAGAAACCCGGGCGC  
CGGCTGGGGCTGGAGTCTCGCTGGCTCCGAGCGCCCCGAGCCCTCGGGCGACAGCGAGGCGAGGACCCA  
GTTGGAGCGGGCCGGGGCGCGGGCAGGGAGGCGCGGAGGGAACCCCGGCCCGGGCCCGCCACC  
CACAGCCGCCCGGGACGCGAGCTCGGGTCCAGGCTCGAGCTTTGCTCACTCAGGGCGCTTCGTGCAGGGA  
ACGCCAGGCCCCCGACGCGACCCACGCGGCCGCTGCCAGCGGGGACCGAGGGGAGCCGGGGCCGCGGCCG  
CGAGTCCAGCTCCCGCCCCCGGGCCCGGCCAGCGACCGCCCCCGCCCGCCAGGGAACCGCCCCGCTCCC  
AGCGACCGCCCCGGGCCCTCGGGGCGGGGACCGCGACCTTCTTGGTGGCGCGGCGAGCCGGGGCGGCTCCTCC  
TTCTCTCCGGCCCTGGCGTGGAGCAGAGGGAACAGGTTCCACGCTGGCGCCCGGCGACCGGGTGGGGCT  
TGGCCCGCTCAGGCCCGAGCAGCTCCATGAGGAGCGCCCGGCGAGGACCCACCACTGTTGCTGCCCACTCTC  
TGCCCACTGACCCCGCTCTCTTGGCCACTGTGACCAACGCATACCTGGGCACACGAGTGTTCACGACACG  
CTGCACGTGAGCGGCGTGTACAATGGGGCTGGCGGGGACACGCAACCGGGCCATGCTGCCAGCCCCCTCAA  
CGTCCGGCTGGAGGCCCTTCAGGGATGGGGGAGCAGCTGACCGAGACCTTCGCCCTGGACACCAACACAG  
GCTCCTTTCTTCA CACCCTGGAGGGCCCGCCCTTCGGGCCCTCCAGTGCATCTATGCGCATCGCACGCTG  
CCCCCGCTCAGGCCCGAGCTTTCGAGTGTCCATCGCCCGCTGGCCCGGGGAGCGGGCCATCAGCTGCTCCT  
GCGGT CAGCCTTCTCCCCAGAAAGCCCAGACCTGGACCTGCATCAGGGTCCCTGACTTCCAGGGAGCCCGGT  
ACCTGTATGGCCA CACCCTCACCCTGAGCAGCCCGGGGGGCCACAGCAAGAGGTA CACATGCTGTGGACA  
CCAGCACCCCCAGACCTGACCTTGGGGAAGGTGAGGAGGCTAGGACGTGGGACTTCTGACAGCAGTGGG  
CGGACGACAGGCTGAGGCTCAGGCCCTGCTCACTGAGGCCCTGCAGCTGCAGGCCCGGGAGGCTCTGTATA  
CGGCTCACGCA CAGGCCCTGGGCCAGCTCTGGGTAGAATGTGGCTTGGACGTGGTGGGGCCCTGCAGCTG  
CGCCAGGCCCTGCGTGGCTCCCTCTACTACCTGCTCAGTGCCTGCCCCAGCCCAAGGCCCCAGGATACAT  
CTGCCATGCGCTCAGTCTTGGGGGCCCTTCCAATGGGAGCGCTGAGGAATGCTACTGGGGCCACGTCTTCT  
GGGACCAGGACCTCTGGATGTTCCCGAGTATCTGATGTTCCACCCAGAAGCGCCAGGGCCATCCTGGAG  
TACCGCATCCGCA CCGCTGACCGGGGCCCTGGAGAACGCCCAAGACCTGGGCTACCAAGGAGCCAAAGTTTGC  
CTGGGAGAGTG CAGACTCCGGCCTAGAGGTTTGGCCTGAGGACATTTACGGAGTCCAGGAGGTCCACGTCA  
ACGGGGCCGCTGGTGTGGCTTTCGAGCTGTACTACCATAACCCAGGACCTGCAGCTATTTGAGAGGCT  
GGTGGCTGGGA CGTGGTCAGGGCTGTGCGCGAGTTTGGTG CAGTCTGTGTGAGTGGAGCCCCAGGGAGGA  
AAAGTACACCTGAGGGGAGT CATGTCCCCGACGAGTACCATTCAGGGGTCAACAACCTGTGTACACCA  
ACGTCCTGCTCCAGAACAGCCTGCGCTTTGCTGCTGCCCTGGGCCAGGACCTGGGTCTTCCCATCCCCAGC  
CAGTGGCTGGCGGTGGCTGACAAGATCAAGGTACCTTTGACGTGGAGCAGAACTTCCACCCGAGTTCGA  
TGGGTATGAGCCTGACCTCGAGTCTGTCTGGAACACCTTCAGT CAGCGGCACCTCCCTGTAGGAGAGG  
TGGTGAAGCAGGCAGACGTCGTGCTCCTGGGATACCCAGTCCCTTCTCCCTGAGTCTGTATGTTGCGAGG  
AAAAATCTGGAGATTTACGAGGCTGTGACGTCCCCCAGGGCCCCGCGCATGACCTGGAGCATGTTTGCTGT  
GGGCTGGATGGAGCTGAAGGACG CAGTGCGGGGCCCGGGGCCCTCTGGACAGGAGCTTTGGCAACATGGCTG  
AACCCTTCAAGGTGTGGACGGAGAATGCAGACGGGT CAGGCGCTGTGAACCTTCTGACAGGCATGGGGGC  
TTCCTGCAGGCGGTGCTTTCGGGTGCACGGGTT CAGGGTCACCCAGCGGGTGTGACCTTTGACCCCTGT  
GTGTCTGTGGGGATCTCCAGAGTGAGCGTCTCGGCATCTTCTACAGGGGAACAAGCTCAACTTCTCTT  
TTCCGAGGACTCCGTGACCGTGGAGGT CACAGCTCGAGCAGGGCCCTGGGCTCCTCACCTGGAGGCTGAG  
CTGTGGCCATCCAGTCCCGGCTCTCCTGTTGCCAGGACACAAGGTCTCCTTTCCCGCTCGGCTGGCCG  
GATACAAATGT CACCCCGAAGCTGCCCTGGAAGTTCCAGCTCCGAGTTCCTTGGGAGGACTTTTTCAGATG  
TTAGGGACCGCTCCAGAGCCCCCTCTGGGTACCCCTGGGTTCCTCCAGCCCCACCGAGTCACTCACTGTG  
GACCCCTGCCTCTGAATAA

1.10 >PY10  
MASSABLDNFNLQALLEQLSQDELKFKSLIRTISLGKELQTVPTQTEVDKANGKQLVEIFTSHSCSYWAGMA  
AIQVFEKMNRTHLSGRADEHCVMPPP

>PY10.dna

Forts. Fig. 1

ATGGCATCTTCTGCAGAGCTGGACTTCAACCTGCAGGCTCTTCTGGAGCAGCTCAGCCAGGATGAGTTGAG  
 CAAGTTCAAGTCTCTGATCAGAACAATCTCCCTGGGAAAGGAGCTACAGACCGTCCCCAGACAGAGGTAG  
 ACAAGGCTAATGGGAAGCAACTGGTAGAAATCTTACCAGCCACTCTGCAGCTACTGGGCAGGGATGGCA  
 GCCATCCAGGCTCTTGAAGAGATGAATCGAACGCATCTGTCTGGGAGAGCTGATGAACACTGTGTGATGCC  
 CCCACCTTAA

\*\*\*\*\*  
 >NALP7/Py11

1.11

FFSLNLRSH T RSTMTSPQLE WTLQTLLEQL NEDELKSFKS LLWAFPLEDV LQKTPWSEVE  
 EADGKKLAEI LVNTSSENWI RNATVNILEE MNLTELCKMA KAEMMEDGQV QEIDNPGLGD  
 AEEDSELAKP GEKEGWRNSM EKQSLVWKNF FWQGDIDNFH DDVTLRNQRF IPFLNPRTPR  
 KLTFYTVVLH GPAGVGKTTL AKKCMLDWTD CNLSPTLRYA FYLSCKELSR MGPCSFAELI  
 SKDWPQLQDD IPSILAQAQR ILFVVDGLDE LKVPPGALIQ DICGDWEKKK PVPVLLGSLI  
 KRKMLPRALR LVTTTPRALR DLQLLAQQPI YIRVEGFLEE DRRAYFLRHF GDEDQAMRAF  
 ELMRSNAALF QLGSAPAVCW IVCTTLKLQM EKGEDPVPTC LTRTGLFLRF LCSRFPQGAQ  
 LRGAIRTLISL LAAQGLWAQM SVFHREDLER LGVQESDLRL FLDGDILRQD RVSKGCYSFI  
 HLSFQQFLTA LFYALEKEEEE EDRDGHAWDI GDVQKLLSGE ERLKNPDLIQ VGHFLFGLAN  
 EKRAKELEAT FRCMRSPDIK QELLQCKAHL HANKPLSVTD LKEVLGCLYE SQEELAKV  
 VAPFKEISIH LTNTSEVMHC SFSLKHCQDL QKLSLQVAKG VFLENYMDFE LDIEFPSSNS  
 NLKFLBVKQS FLSDSSVRIL CDHVTRSTCH LQKVEIKNVT PDTAYRDFCL AFIGKKTILTH  
 LTLAGHIEWE RTMMLMLCDL LRNHKCNLQY LRLGGHCATP EQWAEFFYVL KANQSLKHLR  
 LSNVLLDEG AMLLYKTMTR PKHFLQMLSL ENCRLEAS C KDLAAVLVVS KKLTHLCLAK  
 NPIGDTGVKF LCEGLSYPCD KLQTLVLQOC SITKLGCYRL SEALQEACSL TNLDLISINQI  
 ARGWLILCQA LENPNCNLKH LRLWSCSLMP FYCQHLGSAL LSNQKLETLD LGQNHLWKSQ  
 IIKLPGVLRQ RTGSLKILRL KTYETNLEIK KLEEVKEKN PKLTIDCNAS GATAPPCCDF  
 FC

>NALP7/Py11.cdna

ttccttcagccttaacctaaggtctcactactcggagcactatgacatcgccccagctagag  
 tggactctgcagacccttctggagcagctgaaacgaggtgaattaaagagtttcaaatcc  
 cttttatgggcttttccctcgaagacgtgctacagaagaccccatggtctgaggtggaa  
 gaggtctgatggcaaaaactggcagaaattctggtcaacacctcctcagaaaattggata  
 aggaatgcgactgtgaacatcttgggaagagatgaatctcacggaattgtgtaagatggca  
 aaggctgagatgatggaggacggacaggtgcaagaaatagataatcctgagctgggagat  
 gcagaagaagactcggagttagcaaaagccaggtgaaaaggaaggatggagaaattcaatg  
 gagaacaatcttgggtctggaagaacaccttttggcaaggagacattgacaatttccat  
 gacgacgtcactctgagaacccaacgggttcattccattcttgaatcccagaacaccacgg  
 aagctaacacaccttacacgggtggtgctgcacggccccgcaggcgtggggaaaaccacgtg  
 gccaaaaagtgtatgctggactggacagactgcaacctcagccgacgctcagatacgcg  
 tctacctcagctgcaaggagctcagccgcatggggccctgcagtttgcagagctgatc  
 tccaaagactggcctgaattgcaggatgacattccaagcatcctagcccaagcacagaga  
 atcctgttctggtcgatggccttgatgagctgaaagtcccacctggggcgctgatccag  
 gacatctgcggggactgggagaagaagaagccggtgcccgtcctcctggggagtgtgctg  
 aagaggaagatgttaccagggcagccttgctggtcaccacgcggcccaggggcactgagg  
 gacctccagctcctggcgagcagcgatctacataagggtggagggttcttgaggag  
 gacaggagggtctatttctgagacacttgggagacaggaccaagccatgcgtgccttt  
 gagctaagtaggagcaacgcggccctgttccagctgggctcggcccccgcggtgtgctgg  
 attgtgtgcacgactctgaagctgcagatggagaagggggaggaccgggtcccacactgc  
 ctacccgcacggggctgttctcgttctcctcgtcagccgggttcccgaggggcgacag  
 ctgcggggcgcgctgcggacgctgagcctcctggcgcgagggtcctgtgggagcagatg  
 tccgtgttccaccgagaggacctggaaaggctcgggggtgcaggagtccgacctccgtctg  
 ttcttgagcggagacatcctccgacaggacagagtctccaaaggctgctactcctcactc  
 cacctcagcttccagcagtttctcactgccctgttctacgccctggagaaggaggaggag  
 gaggacagggacggccacgcctgggacattggggacgtacagaagctgcttccggagaa  
 gaagactcaagaaccccgactgattcaagtaggacacttcttattcggcctcgctaac  
 gagaagagagccaaggagtggaggccactttgggtgcggatgtcaccggacatcaaa  
 caggattgtgcaatgcaaagcacatcttcatgcaataagcccttatccgtgaccgac  
 ctgaaggaggtcttgggctgcctgtatgagtctcaggaggaggagctggcgagggtgtg  
 gtggccccgttcaaggaaatttctattcacctgacaaatacttctgaagtgtgcatgtg  
 tccctcagcctgaagcattgtcaagacttgcaaaactctcactgcaggttagcaaaagg  
 gtgttccctggagaattacatggatttgaactggacattgaatttgaagctcaaacagc

Forts. Fig. 1

aacctcaagtttctggaagtgaacaaagcttctctgagtgactcttctgtgaggattctt  
 tgtgaccacgtaacccgtagcacctgtcatctgcagaaagtggagattaaaaacgtcacc  
 cctgacacccgctaccgggacttctgtcttctgcttctcattgggaagaagacctcacgcac  
 ctgacctggcagggcacatcgagtgggaacgcacgatgatgctgatgctgtgacctg  
 ctgagaaatcataaatgcaacctgcagtagctgaggttgggaggtcactgtgccaccccg  
 gagcagtgggctgaattcttctatgtctcctcaaagccaaccagtcctgaagcactgctg  
 ctctcagccaatgtgctcctggatgaggggtgcatgttctgtgtacaagaccatgacacgc  
 caaaaacacttctctgcagatgtgtgcttggaaaactgtcgtcttacagaagccagttgc  
 aaggaccttgcgtgctgtcttgggtgtcagcaagaagctgacacacctgtgcttggccaag  
 aaccccatggggatacaggggtgaagtttctgtgtgagggcttgagtaccctgattgt  
 aaactgcagaccttgggtgttacagcaatgcagcataaccaagcttggctgtagatatctc  
 tcagagggcgtccaagaagcctgcagcctcacaacacctggacttgagtatcaaccagata  
 gctcgtggattgtggattctctgtcaggcattagagaatccaaactgtaacctaaaacac  
 ctacgcctctggagctgctccctcatgcttcttattgtcagcatcttggatctgctctc  
 ctacgcaatcagaagcttgaacctctggacctgggcccagaatcatttgtggaagagtggc  
 ataattaagctcttgggggttctaagacaaagaactggatccttgaagatactcaggttg  
 aagacctatgaaactaatttggaaatcaagaagctgttggagggaagtgaagaaaaagaat  
 cccaagctgactattgattgcaatgcttccggggcaacggcacctccgtgctgtgacttt  
 ttttgcgtga

## 1.12 &gt;NALP8/Py12

MSDVNPPSDT PIPFSSSSTH SSHILPWTF SYPGSPCENG VMLYMRNVSH BELQRFKQLL  
 LTELSTGTMP ITWDQVETAS WAEVHLLIE RFPGRRAWDV TSNIFAIMNC DKMCLVLRRE  
 INAILPTLEP EDLNVGETQV NLEEGESGKI RRYKSNVMEK FFPIWDITW PGNQORDFFYQ  
 GVHRHEEYLP CILLPKRPQG RQPKTVAIQG APGIGKTILA KKVMFEWARN KFYAHKRWCA  
 FYFHCQEVNQ TTDQSFSSELI EQKWPGSQDL VSKIMSKPDQ LLLLLLDGFEE LTSTLIDRLE  
 DLSEDWRQKL PGSVLLSSLL SKTMLPEATL LIMIRFTSWQ TCKPLLKCP S LVTLPGFNTM  
 EKIKYFQMYF GHTEEGDQVL SFAMENTILF SMCRVFVVCW MCVSGLKQOM ERGNLITQSC  
 PNATSVFVRY ISSLFPTRAE NFRKIHQAQ LEGLCHLAAD SMWHRKWVLG KEDLEEAKLD  
 QTGVTAFLGM SILRRIAGEE DHYVFTLVTF QEFFAALFYV LCFFPQRLKNF HVLSHVNIQR  
 LIASPRGSKS YLSHMLFLF GFLNEACASA VEQSFQCKVS FGNKRKLLKV IPLLHKCDPP  
 SPGSGVPQLF YCLHEIREEA FVSQALNDYH KVVLRIGNNK EVQVSAFCLK RCQYLHEVEL  
 TVTLNFMNVW KLSSSSHPGS R

## &gt;NALP8/Py12---Py8.dna

gaaaaaatcaagatttccagatgtatttggacacacagaggaggagaccaagtcttg  
 agtttgcgccatggaaaacaccattctctctccatgtgcgggtccctgtggttgcgtgg  
 atgggtctgctctggtctgaaacagcaaatggagagaggaaacaatctcacacagtcagtg  
 ccaaatgccacctctgtgttctgtccggtatatttctagcttgttcccaccagagctgag  
 aacttttccagaaagatccaccaagcacaactggaaggtctgtgtcacttggccgcagac  
 agcatgtggcacaggaaatgggtgttaggtaaagaagatcttgaggaagccaagctggat  
 cagacgggagtcacgccttcttggcatgagtattcttcggagaattgcaggtgaggaa  
 gacctatgtctttaccctcgtgacttttcaggaatttttgcggccttgtttatgtt  
 ctctgtttcccacaaagactcaaaaattttcatgtgttgagccagtgaaatccagcgc  
 ctgatagcgagtcccagaggaagcaaaagctatctctctcacatgggactttcttattc  
 ggtttctgaacgaggcctgcgcttcggccgtggaacagtcattccaatgcaaggtgtct  
 ttcggtaataagaggaaactgctgaaagtacacctctgttgcataaatgtgacccacct  
 tctccgggagtgagggtcccgaggttattctactgtctgcagtaaatccgggaggaagcc  
 tttgtgaagccaagccctaaatgattatcataaagttgtcttgagaattggcaacaacaaa  
 gaagtcaagtgctctgcttttgcctgaacgggtgtcaatatttgcagtgaggtggaactg  
 accgtcaccctgaacttcatgaacgtgtggaagctcagctccagctcccacctcgtgct  
 gacctaaaggcgtgtgaatagccatgttgaaccaggacttaacgggtgtttgacgggg  
 aaccagactctgagatacttggaaatacaacatgtggaagtgagtgccaaagctgtgaag  
 ctctatgcagggtgctgagatcccccggtgcgctctgcagtgctcaggttgaagac  
 tgcttggccaccctagaatttggactgatcttggcaataatcttcaaggtaacgggcat  
 ctaagactctcactaagaaaaaactccctggagaactgtggggcgattacctgtct  
 gtggcccgactggagaggctgtcgagagtaagatgctgacccacctgagcttggcagaa

Forks. Fig. 1

aacgccttgaagatgaagggccaagcatatttggatgcctgccacacctgagatgt  
cctctgcagaggctgggtactgagaaagtgtgacttgacctttaattgctgtcaggatatg  
atctctgcgctctgtaaaaataaaacctgaaaagtcttgaccttaagttttaatagcctg  
aaggatgatgggtgatcctgctgtgtgagggcctgaagaacctgactgtacattacag  
atcctggagctggaaaaactgcctgttcacctccatctgctgccaggccatggcttccatg  
ctccgcaaaaaccaacatctgagacatctggacttgagcaagaatgcgattggagctcat  
gggtattctgaccttgtgagaggccttctcaagccaaaagaagagagaagagggtcatttc  
actattcacaatagccaagatttggagcacctaagtgtccatcaacagatgaatggata  
aagaaaatgtggtacttacgcacaatggagtactattcagccatgaaaaagaaacttaag  
tgtagaaacaatgggtatcatagaaacagcacactgggtgctcaggctcctacttgcctata  
ttaccaagaatccacttttccccaaaacctgagctctcagccttgtatcaagatggaa  
ggagacaaatcgctcaccttttccagctacgggctgcaatgggtgctctatgagctagac  
aaggagaatttcagacattcaaggaattactaaagaagaatcttcagaatcgaccaca  
tgctctattccacagtttgaatcgagaatgccacgtggaatgtctggcactcctcttg  
ctgagttatttgagcatcgtggcctgggctacgtccattagcatctttgaaaacatg  
aacctgcgaacctctcggagaaggcacgggatgacatgaaaagacattcaccagaagat  
cctgaagcaacgatgactgaccaaggaccaagcaaggaaaaagtggcagggaatttcaca  
gctgtgcaacaagatagtgccacagctgcagagacaaaagaacaagaatttcacaagct  
atggaacaagaagggtgccacagcagcagagacagaagaacaagaatttcacaagctatg  
gaacaagaagggtgccacagcagcagagacagaagaacaaggacatggaggtgacacatgg  
gactacaagagtcacgtgatgaccaaattcgctgaggaggaggatgtacgtcgtagtttt  
gaaaaactgctgctgactggcgggaaatgcaaacgttggctgggtgcttttgattcagac  
cgggtggggcttccggcctcgcaagggtggttctgcacggaaagtcaaggaatgggaaatcg  
gctctagccagaaggatcgctgctgtgctggcgcaagggtggactctaccagggaatgttc  
tcctacgtcttcttccctcccggttagagagatgcagcgggaagaaggagagcagtgctaca  
gagttcatctccaggagtggtggcagactccagggtccgggtgacggagatcatgtcccg  
ccagaagggtgtgttcatcattgacgggttcgatgacctgggctctgtcctcaacaat  
gacacaaggctctgcaaagactgggctgagaagcagcctccgttcacctcatacgcagt  
ctgctgaggaaggctcctgctccctgagtccttccctgatcgtcacgctcagagacgtggg  
acagagaagctcaagtcaaggtcgtgtctcccggttacctgttagttagagggaatctcc  
ggggaacaaagaaatccacttgctccttgagcgcgggattggtgagcatcagaagacaca  
gggttgctgctgcatcatgaacaacctgagctgctcgaccagtgccagggtgcccgcgctg  
ggctctctcatctgctggccttgacgtgcagctgcaggacgtgggtgggggagagcgtcgcccc  
ttcaaccaaaccgtcacaggcctgcacggcgttttggtgttcatcagctcaccctcoga  
ggcgtggtccggcgtgtctcaatctggaggaaagagttgtcctgaagcgcttctgcccgt  
atggctgtggaggagtggtggaataggaagtcagtggttgacgggtgacgacctcatggtt  
caaggactcggggagtgctgagctccgtgctctgtttcacatgaacatccttctccagac  
agccactgtgaggagtactacaccttcttccacctcagtcctcaggacttctgtgccgcc  
ttgtactacgtgttagagggcctggaaatcgagccagctctctgcccctctgtacgttgag  
aagacaagagggtccatggagcttaaacaggcaggttccatataccactcgctttggatg  
aagcgtttcttgtttggcctcgtagcgaagacgttaaggaggccactggaggtcctgctg  
ggctgtcccggtcccttgggggtgaagcagaagcttctgcactgggtctctctgttgggt  
cagcagcctaattgccaccacccaggagacacctggagcgccttccactgtcttttcgag  
actcaagacaaagagtttgttcgcttggcattaaacagcttccaagaagtgtggcttccg  
attaaccagaacctggacttgatagcatcttcttctgectccagcactgtccgtatttg  
cggaaaatccgggtggatgtcaaaggatcttcccaagagatgagtcggctgaggtatgt  
cctgtgggtccctctatggatgcgggataagacctcattgaggagcagtggggaagatttc  
tgctccatgcttggcaccacccacacctgcggcagctggacctgggcagcagcatcctg  
acagagcggggccatgaagacctgtgtgccaagctgaggcatcccacctgcaagatacag  
acctgatgtttagaatgcacagattacccctgggtgtgcagcacctctggagaatcgct  
atggccaacgctaacctaaagatccctcaacttgggagggcaccacctgaagggaaggag  
gtaaggatggcgtgtgaagccttaaaacacccaaaatgtttgttggagctcttgaggctg  
gattgtctgtggattgacctgacctgttacctgaagatctcccaaatccttacgacctcc  
cccagctgaaatctctgagcctggcaggaaacaagggtgacagaccaggagtaatgcct  
ctcagtgatgccttgagagctctccagtgccctgcagaagctgatactggaggactgt  
ggcactcacagccaggggttgccagagctgtggcctcagccctcgtagcaaccggagcttg  
acacacctgtgcctatccaacaacagcctggggaacgaagggtgtaaatctactgtgtcga  
tccatgaggcttccccactgtagtctgcagaggctgatgtgaatcagtgccacctggac

Forks. Fig. 1

acggctggctgtgggttttcttgcaacttgccgttatgggtaactcatggctgacgcacctg  
agccttagcatgaacctgtggaagacaatggcgtgaagcttctgtgcgaggtcatgaga  
gaacctcttgtcatctccaggacctggagttggtaaagtgtcatctcaccgccgcgtgc  
tgtgagagtctgtcctgtgtgatctcgaggagcagacacctgaagagcctggatctcacg  
gacaatgccctgggtgacgggtgggttgctgcactgtgcgagggactgaagcaaaagac  
agtgttctgacgagactcgggttgaaggcatgtggactgacttctgat tgcgtgtgaggca  
ctctccttggccctttcctgcaaccggcatctgaccagtctaaacctgggtgcagaataac  
ttcagtcccaaaggatgatgaagctgtgttcggcctttgcctgtcccacgtctaactta  
cagataattggcaatgactctgaagaaaatgacgttcttcgagaatctgctctagtagtt  
ttgcttaaagtcatgtttccagaacctatcaatgacattaagggagaaacttactgtac  
ctcccaaacctataacacgacccggcacagagactctgaggaaggaattcatggatgg  
actgaaggctgtggaatggcagtagtaccctgtgcaataaggagctgctggaggaaagtg  
cagctactcaagcccgagtcgttaattgacggtagttggcattcttttgatgaagtac  
cgattggatcttcaaagccagcaaaacagtcactcagcaagacagacttacaatctcatg  
gcatcacagaagtcatgacccatcaacctgccacattccgtttggatagaagcactgct  
gacgggtgggacccgaccttccacatcggggtcccgctgtgggctgtagggtgttcagt  
gacgtccctgcttttacctgccaggttaagagatgaagtaggtatccttgttcacaacagc  
caaaaggtgcagacaaccacgtgtctatcagcagatga  
\*\*\*\*\*

1.13 >NALP9/Py13  
MAESFFSDFG LLWYLKELRK EEFWKFKELL KQPLEKFELK PIPWARKKA SKEDVAKLLD  
KHYPGKQAWV VTLNLFLQIN RKDLWTKAQE EMRSILASL FGGSSRGAQL LFCPRWKDLP  
LWAKVVIVFD PGETFRTDAY GAVREEVDTH PAGHISRISP GATNGVIDIT ARLSSRPFSI  
LSA

>NALP9/Py13.cdna

atggcagaatcttttttttcggattttggcttgtgtgtgtatctgaaggagctcagaaag  
gaagagtttttgaaatttaaggagctcctcaacaacctttggagaaattgaactcaag  
ccaatccctgggtgagctgaagaaggcctccaaagaagatgtagcaagctgctggac  
aaacattaccagaaagcaggcatgggaggttaacactgaacctgtttctacagatcaat  
aggaaagatctctggacaaaggctcaggaagagatgagaagaagcattcttgcgagcttg  
tttgaggttctagtaggggagcacagcttctcttctgcccgcgatggaaggaccttct  
ctatgggcaaaggttgtcatcgtctttgaccaggaggagactttcaggacggagcgcata  
ggagcagtgagggaagtggaacacccacccagctggccacatcagccgaattagccct  
ggggcgaccaatggggtgacagacatcacagccaggtgtcctcacgtcctggaagcatt  
ctttctgcataa  
\*\*\*\*\*

1.14 >NALP10/Py14  
MAMAKARKPR EALLWALS DL EENDFKKLKF YLRDMTLSEG QPPLARGELE GLIFVDLAEL  
LISKYGEKEA VKVVLKGLKV MNLLLELVDQL SHICLHGVM HWKDNSRQKK VLDWATGTL  
PGRFDYVFYV SCKEVVILLE SKLEQLLFWC CGDNQAPVTE ILRQPERLLF ILDGFDLQR  
PFERKLKRG LSPKESLLHL LIRRHTLPTC SLITTRPLA LRNLEPLLKQ ARHVHILGFS  
EERARYPSS YFTDEKQADR AFDIVQKNDI LYKACQVPGI CWVVC SWLQG QMERGKVLE  
TPRNSTDIFM AYVSTFLPPD DDGGCSELSR HRVLRSLCSL AAEQIQHQR FEEAELRKH  
NLDGPRLAAP LSSNDYQLGL AIKKFYSFRH ISFQDFHAM SYLVKEDQSR LGKESRREVQ  
RLLEVKEQEG NDEMTLTMQF LLDISKKDSF SNLELKFCFR ISPCLAQDLK HFKEQMESMK  
HNRTWDLBFS LYEAKIKNLV KVFR

>NALP10/Py14

atggccatggccaaggccagaaagcccgaggaggttgcctctgggcttgagtgacctt  
gaggagaacgatttcaagaagttaaagttctacttacgggatatgacctgtctgagggc  
cagccccactggccagaggggagttggaggcctgattccggtggacctggcagaatta  
ctgatttcaaagtatggagaaaaggaggtgtgaaagttgtcctcaagggttgaaggtc  
atgaacctgttggaacttgtggaccagctcagccatattgtctgcaggggtcggctgg  
cactggaagacaactctcgccagaaaagggtgttgactgggccaacgggtactctgtac  
ccagccgggttgattatgtctttatgtaagctgcaagaagtggtcctgctgctggag  
agcaaacggagcagctcctttctggtgtgcggggacaatcaagccctgtcacagag  
attctcaqcaqcccaqcaqccctcctgttcatcctggatggctttgatgagctgcagagg

Forts. Fig. 1

```

ccctttgaagaaaagttgaagaagaggggtttgagtcaccaaggagagcctgtgcacctt
ctaattaggagacatacactcccacgtgtccttctcatcaccaccggccctggct
ttgaggaatctggagcccttgtgtgaaacaagcacgtcatgtccatatcctaggcttctct
gaggaggagagggcgaggtaacttcagctcctatttcacggatgagaagcaagctgacggt
gccttcgacattgtacagaaaaatgacattctctacaaagcgtgtcaggttccaggcatt
tgctgggtgggtctgtcctcctgggtgcaggggcagatggagagaggcaagttgtcttagag
acacctagaacacagcactgacatcttcatggcttacgtctccaccttctgcccgcgat
gatgatgggggtgtcctcgagcttcccgccacaggggtcctgaggagtctgtgtcccta
gcagctgaagggtattcagcaccagagggtcctatttgaagaagctgagctcaggaaacat
aatttagatggccccaggttgcgcttctctgagtagtaacgactaccaattgggactt
gccatcaagaagtctacagcttccgccacatcagcttccaggacttttttcatgccatg
tcttacctgggtgaaagaggaccaaagccggctggggaaggagtcccgagagaagtgcga
agggtgtgtgggtaaggagcaggaagggaatgatgagatgacccctcactatgcagttt
ttactggacatctcgaaaaagacagcttctcgaaacttgaggtcaagttctgtctcaga
atttctcctgttttagcgcaggatctgaagcattttaagaacagatggaatctatgaag
cacaacaggacctgggatttgggaattctcctgtatgaagctaaaataaagaatctggtga
aaagtattcagatga

```

1.15 >NALP11/Py15

```

MARSDSTDFD LLWYLENLSD KEFQSFKKYL ARKILDFKLP QFPLIQMTKE ELANVLPISY
EGQYIWNMLF SIFSMRKED LCRKIIGRRN HVFYILQLAY DSTSYYSANN LNVFLMGERA
SGKTIVINLA VLRWIKGEMW QNMISYVVHL TSHEINQMTN SSLAELIAKD WPDGQAPIAD
ILSDPKKLLF ILEDLDNIRF ELNVNESALC SNSTQKVPIP VLLVSLKRRK MAPGCWFLIS
SRPTRGNVVK TFLKEVDCTT TLQLSNGKRE IYFNSFFKDR QRASAAQLV HEDEILVGLC
RVAILCWITC TVLKRQMDKG RDFQLCCQTP TDLHAFLAD ALTSEAGLTA NOYHLGLLKR
LCLLAAGGLF LSTLNFGED LRCVGFTEAD VSVLQAANIL LPSNTHKDRY KFIHLNVQEF
CTAIAFLMAV PNYLIPSGSR EYKEKREQYS DFNQVFTFIF GLLNANRRKI LETSFGYQLP
MVDSEFKWYSV GYMKHLDRDP EKLTHMPLF YCLYENREEE FVKTIVDALM EVTIVYLQSDK
DMVSLYCLD YCCHLRTLKL SVQRIFQNK EPLIRPTARLS YVSTASGFED LLKALARNRS
LTYLSINCTS ISLNMFSILH DILHEPTCQI SHLX

```

>NALP11/Py15.cdna

```

atggcagaatcggattctactgactttgacctgtgtggtatctagagaatctcagtgac
aaggaatttcagagttttaagaagtatctggcagcgaagattcttgatttcaaaactgcc
cagtttccactgatacagatgacaaaagaagaactggctaacgtgttgccaatctcttat
gaggacagtatatatggaatatgtctcttcagcatatttcaatgatgcgtaagggaagat
ctttgtaggaagatcattggcagacgaaacctgtgttctacatacttcaatttagcctat
gattctaccagctattattcagcaacaatctcaatgtgttctctgatgggagagagagca
tctggaaaaactattgtataaatctggctgtgttgagggtggatcaagggtgagatgtgg
cagaacatgatctcgtacgtcgttcacctcacttctcacgaaataaaccagatgaccaac
agcagcttggtgagctaatcgccaaggactggcctgacggccagggtcccatcgagac
atcctgtctgatcccaagaactccttttcatcctcgaggacttggaacaataagattc
gagttaaatgtcaatgaaagtgtttgtgtagtaacagcaccagaaagtcccattcca
gttctcctgggtcagttgtgtgaagagaaaaatggctccaggctgtgttctcatctcc
tcaaggccacacgtgggaataatgtaaaaacgttcttgaaagaggttagattgtgtcacg
accttgagctgtcgaatgggaagaggagatatattttaactcttctttaagaccgc
cagagggcgctcggcagccctccagcttgatcatgaggatgaaatactcgtgggtctgtgc
cgagtcgccatcttatgtggatcacgtgtactgtcctgaagcggcagatggacaagggg
cgtgacttccagctctgtgtgcaaacacccactgatctacatgccactttcttgctgat
gcgttgacatcagaggctggacttactgccaatcagtatcacctagggtctcctaaaacgt
ctgtgtttgtgtggctgcaggaggactgttctgagcacctgaatttcagtgggtgaagac
ctcagatgtgttgggtttactgaggtgatgtctctgtgttgaggccgcgaatattctt
ttgccgagcaacactcataaagaccgttacaagttcatacacttgaacgtccaggagttt
tgtacagccattgcatttctgatggcagtagccaactatctgatccctcaggcagcaga
gagtataaagagaagagagaacaatactctgactttaatcaagtgtttactttcatttt
ggcttctaaatgcaaacaggagaaagattcttgagacatcctttggataccagctaccg
atggtagacagcttcaagtgggtactcgggtgggatacatgaaacatttggaccgtgaccg
gaaaagttgacgcaccatagcctttgttttactgtctctatgagaatcggaagaagaa

```



Forts. Fig. 1

tttgtgaagacgattgtggatgctctcatggaggttacagtttaccttcaatcagacaag  
 gatatgatgggtctcattatactgtctggattactgtgtcacctgaggacacttaagttg  
 agtgttcagcgcacatctttcaaaacaagagccacttataaggccaactgctaggttgcc  
 tatgtctcgactgcttcttggttttgaagacttactcaaggccttggctcgtaatcgagc  
 ctgacatacctgagtatcaactgtacgtccatttccctaaatatgttttacttctgcat  
 gacatctgcacgagccacatgccaaataagtcactctgagn

1.16

&gt;Py16 (mouse)

MASFFSDFGMLMWYLEELNKKEFMKFKEFLKQELQLRLKQISWTEVKKASREDLANLLK  
 HYEEKKAWDMTFKIFQKMNKDLMERAGREIAGLSNTGPPDRYEAPNTHTVEDFQVCVHS  
 EMMHLTLKRLQAPGNLEARI PMVIEATVVFKTGEPDAIALEVELQMGFDLSCILPNVSA  
 YKVLDIVLPEDPAIPLLGIYPEDVPTVRPGYPTABEQSDLSKSHLMKTIIDFKIINNS  
 LKEIQENSGKQV

&gt;Py16.dna

atggcctctcttttttctgattttggccttatgtggacttagaagagctaaacaagaaa  
 gaattcatgaagtttaaggaattccctcaaacaggagattttgcagttgagactgaaacag  
 atttcttgaccgaagtgaagaaggcatctcgtgaagaccttgccaacttactgttgaaa  
 cattatgaggagaagaagcctgggatatgaccttcaaaatctccagaagatgaatagg  
 aaggatctcatggagagggcaggaagagagattgtgtgctctcaaacactggaccacca  
 gacagatatgaggccccaacacacatacagtagaggacttccaggtctgtgttcattca  
 gagatgatgcacctaaccctcaagagactgcagggcccgagggaatttagaggccaggatt  
 ccaatggctcatagaagcaactgttgattcaagaaaactggggagcctgatgctattgcc  
 ttgggaagtggaaacttcagatgggacctgatttgcctgcatattacccaatgtgtcggt  
 taccgagatttgacatagtagtactaccggaggatcccgcaatacctctcctgggcatatat  
 ccagaagatgttccaaccgtaagaccaggctaccctaaaacagctgaagaacaagattct  
 gacctaaaatcccctcctcatgaagataatagaagactttaaggagattataaacaattca  
 cttaaagaaatacaggaaaactcaggcaaacagggtataa

1.17

&gt;NALP13/Py17

MYEFYIHKG Y DDVSSDNSRE KIKGEPSECE LGHFPRI PWA NLRAADPLNL SFLLEHFFPK  
 GQAWKVVLGI FQTMNLTS LC EKVRAMKEN VQTQELQDPT QEDLEMLEAA AGNMQTQGCQ  
 DPNQEELEDEL EETGNVQAQ GCQDPNQEEP EMLEADHRR KYRENMAEL LETWDNISWP  
 KDHYVIRNTS KDEHEELQRL LDPNRTAQA QTTVLVGRAG VGKTTLAMRA MLHWANGVLF  
 QQRFSYV FYL SCHKIRYMK TTFaelISLD WPD FAPIEE FMSQPEKLLF IIDGFEEIII  
 SESRSSESLDD GSPCTDWYQE LPVT KILHSL LKKELVPLAT LLITIKTW FV RDLKASLVNP  
 CFVQITGFTG DDLRVYFMRH FDSSEVEKI LQQLRKNETL FHSCSAPMVC WTVCSCLKQP  
 KVRYYDLQSI TQTTTSLYAY FFSNLFSTAE VDLADDSWPG QWRALCSLAI EGLWSMNFTF  
 NKEDTEIEGL EVPFIDSLYE FNILQKINDC GGCTTFTHLS FQEFFAAMSF VLEEPREFPP  
 HSTKPQEMKM LLQHVLLDKE AYWTFVVLFF FGLLNKN IAR ELEDTLHCKI SPRVMEELLK  
 WGEELX

&gt;NALP13/Py17.cdna

atgagtgcagtgatccaccctctgacacccccattcccttttcatcctcctccactcac  
 agttctcatattccgcccctggacattctcttgcctaccccggtccccatgtgaaaatggg  
 gtcattgctgacatgagaaacgtgagccatgaggagctacaacgggttcaagcagctctta  
 ctgactgagctcagtagtggcaccatgcccacacctgggaccaggtcgagacagccagc  
 tgggcagaggtgggtcattctcttgatagagcggttccctggacgacgcgttgggatgtg  
 acttcgaacatctttgccattatgaactgtgataaaatgtgtgttagtccgcagagag  
 ataaatgccattctgcctacettggaaccagaggacttgaatgtgggagaaaacacaggtg  
 aatctggaggaaggagaatctggtaaaatacggcggtataaatcgaatgtgatggaaaag  
 tttttcccatatgggacattacgacttggcctggaaccagagggacttcttctaccaa  
 ggtgtacacaggcagcaggagtagtaccatgtctgcttctgcccacaaagacccaggggt  
 agacagcccaagaccgtggccatacaggagctcctgggagcggaaaaacaatcctggcc  
 aaaaagggtgattgttgagtgggccagaaacaagttctacgcccaacagcgtggtgtgct  
 ttctacttccattgccaagaggtgaaccagacgacagaccagagcttctccgagctgatt  
 gagcaaaagtggcctggatctcaggacctcgtgtcaaagattatgtccaaacccgaccaa  
 cttctgctgctcttgatggcttggaggagctcacatctaccctcattgacagactggag  
 gacctgagtgaagactggaggcagaaattgcctgggtctgtcctactgagcagtttgcgtg

Forts. Fig. 1

agcaaacgatgcttccagaggccacgctactgatcatgataagatttacctcttggcag  
acatgcaagcccttgctgaaatgtccctctctcgtaacccttccgggttttaacgatg  
gaaaaaatcaagtatttccagatgtatttggacacacagaggaggagaccaagtcttg  
agtttcgcatggaacacacattctcttctccatgtgcgggtccctgtggtttgctgg  
atggtctgctctggtctgaaacagcaaatggagagaggaaacaatctcacacagtcagtg  
ccaaatgccacctctgtgttctgctccggtatatttctagcttgtttccaccagagctgag  
aacttttccagaaagatccaccaagcacaactggaaggtctgtgtcacttggccgcagac  
agcatgtggcagcaggaaatgggtgttaggtaaagaagatcttgaggaaagccaagctggat  
cagacgggagtcacgccttcttggcatgagttcttccggagaattgcaggtgaggaa  
gaccactatgtctttaccctctgacttttcaggaatttttgcggtctgttttatgtt  
ctctgtttccacaaagactcaaaaatttcatgtgttgagccacgtgaatatccagcgc  
ctgatagcaggtcccagaggaaagcaaaagctatctctctcacatgggacttttcttatte  
ggttttctgaacgaggtctgcttccggtgggaacagtcattccaatgcaaggtgtct  
ttcggtaataagaggaaactgtgaaagtcatacctctgttgcatataatgtgaccacct  
tctccgggagtggtgggtcccgagttattctactgtctgcatgaaatccgggaggaagcc  
tttgtaagccaagccctaataatgattatcataaagttgtcttgagaattggcaacaacaa  
gaagttcaagtgtctgcttttgcctgaagcgggtgtcaatatttgcatgaggtggaactg  
accgtcacctgaacttcatgaacgtgtggaagctcagctccagctcccatcctggctct  
gacctaaaggcgtgtgaatagcaccatgttgaaccaggacttaatcggtgttttgacgggg  
aaccagcatctgagatacttggaaatacaacatgtggaagtggagtccaaagctgtgaag  
cttctatgacgggtgtgagatcccccggtgctgctgagtgctcaggttggagac  
tgcttggccacccctagaatttggactgatcttggcaataatcttcaaggtaacgggcat  
ctaaagactctcatataagaaaaactccctggagaactgtggggcgtattacctgtct  
gtggcccagctggagaggtgtcgcagagtaagatgctgaccacctgagcttggcagaa  
aacgccttgaaagatgaaggggccaagcatatttggaaatgcctgccacacctgagatgt  
cctctgacagaggtggtactgagaagtgtgacttgaccttaattgtgtcaggatag  
atctctgctctctgtaaaaaataaaacccctgaaaagctcttgacctaaagttttaatagcctg  
aaggatgtaggggtgtacctgtgtgtgaggccctgaagaaccctgactgtacattacag  
atcctggagctggaaaactgcctgttcacctccatctgctgccaggccatggcttccatg  
ctccgcaaaaaccaatctgagacatctggacttgagcaagaatgcgattggagctcat  
ggtattctgacctgtgagggccttctcaagccaaaagaagagagaagaggtcattttc  
actattcacaatagccaagatttgggaagcactaaagtgtccatcaacagatgaatggata  
aagaaatgtggtacttacgcacaatggagttactattcagccatgaaaagaaacttaag  
tgtagaacaatggtatcatagaacagcacaactggtgtcaggctcctacttgcctata  
ttaccaagaatccacttttccccaaaacctgagctctcagccttgtatcaagatggaa  
ggagacaaatcgctcacttttccagctacgggtgtcaatgggtgtctctatgagctagac  
aaggaagaatttcagacattcaaggaattactaaagaagaatcttcagaatcgaccaca  
tgctctattccacagtttgaatcgagaatgccacgtggaatgtctggcactcctctg  
catgagttattggagcatcgctggcctgggtacgtccattagcatctttgaaaacatg  
aacctgcgaacccctctcggagaaggcagggatgacatgaaaagacattcaccagaagat  
cctgaagcaacgatgactgaccaaggacccaagcaaggaaaaagtggcaggaatttcacaa  
gctgtgcaacaagatagtgccacagctgcagagacaaaagaacaagaaatttcacaagct  
atggaaacaagaggtgccacagcagcagagacagaagaacaagaaatttcacaagctatg  
gaacaagaaggtgccacagcagcagagacagaagaacaaggacatggaggtgacacatgg  
gactacaagagtcacgtgatgaccaaattcgctgaggaggaggtgtacgtcgtagttt  
gaaaacactgctgctgactggcgggaaatgcaaacgttgggtggtgttttgattcagac  
cgggtggggcttccggcctcgacaggtggttctgcacggaaagttaggaattgggaaatcg  
gctctagccagaaggtcgctgctgctgggcgcaaggtggactctaccagggaatgttc  
tctacgtcttcttctccctcttagagagatgcagcggaaagagagagcagtgatca  
gagttctctccaggagtgggcagactccagggtccgggtgacggagatcatgtccga  
ccagaaggctgtgttcatcattgacgggttctgatgacctgggtctgtcctcaacaat  
gacacaaagctctgcaaaagactgggtgagaagcagcctccgttaccctcatacgcag  
ctgctgaggaaggtcctgctcctgagtccttctgatcgctcaccgtcagagacgtgggc  
acagagaagctcaagtgcagaggtcggtctccccgttacctgttagttagaggaatctcc  
ggggaacaaaagaatccacttgcctttagcgcgggattgggtgagcatcagaagacaaa  
gggttgcgtgcgatcatgaacaaccgtgagctgctcgaccagtgccaggtgcccgcgtg  
ggctctctcatctgctggcctgcagctgcaggacgtgggtgggggagagcgtcgcccc  
ttcaacaaaacgctcacaggcctgcacgcgcttttgtgtttcatcagctcaccctcga

Forts. Fig. 1

ggcggtgggtccggcgctgtctcaatctggaggaaagagttgtcctgaagcgcttctgcggt  
 atggctgtggaggagtggtggaataggaagtcagtggttgacgggtgacgacctcatgggt  
 caaggactcggggagtctgagctccgtgctctgtttcacatgaacatccttctcccagac  
 agccactgtgaggagtactacaccttcttccacctcagtcctccaggacttctgtgcccgc  
 ttgtactacgtgttagagggcctggaaatcgagccagctctctgcccctctgtacgttgag  
 aagacaaagagggtccatggagcttaaacaggcaggcttccatatccactcgtttggatg  
 aagcggttctgtttggcctcgtgagcgaagacgtaaggaggccactggaggtcctgctg  
 ggctgtcccgttcccctgggggtgaagcagaagcttctgcactgggtctctctgttgggt  
 cagcagcctaatagccaccacccaggagacacccctggacgccttccactgtcttttcgag  
 actcaagacaaagagttgttgccttggcattaaacagcttccaagaagtgtggcttcg  
 attaacagaacctggacttgatagcatcttcttctgcccctcagcactgtccgtatttg  
 cggaaaattcgggtggatgtcaaagggatcttcccaagagatgagtcgctgagggcatgt  
 cctgtggtccctctatggatgcccggataagaccctcattgaggagcagtggaagatttc  
 tgctccatgcttggcaccacccacacctgcggcagctggacctgggcagcagcatcctg  
 acagagcgggcccataagaccctgtgtgccaagctgaggcatcccacctgcaagatacag  
 acctgatgtttagaaatgcacagattaccctgggtgtgcagcacctctggagaatcgtc  
 atggccaaccgtaacctaaagatccctcaactgggaggcaccacctgaaggaaaggat  
 gtaaggatggcgtgtgaagccttaaaacacccaaaatgtttgttggagtcctttgaggctg  
 gattgtgtggattgacctgacctgttacctgaagatctcccacaccccttacgacctcc  
 ccagcctgaaatctctgagcctggcaggaacaaggtgacagaccaggagtaaatgcct  
 ctgagtgatgccttgagagctctccagtgccctgcagaagctgatactggaggactgt  
 ggcacacagccacgggttgccagagctgtgacctcagccctcgtcagcaaccggagcttg  
 acacacctgtgcctatccaacaacagcctggggaacgaaggtgtaaatctactgtgtcga  
 tccatgaggtctcccactgtagtctgcagaggtgatgctgaatcagtgccacctggac  
 acggctggctgtggtttcttgcacttgcgcttatgggttaactcatggctgacgcaacctg  
 agccttagcatgaacctgtggaagacaatggcgtgaagcttctgtgaggtcatgaga  
 gaacctcttgtcatctccaggacctggagttggtaaaagtgtcatctcaccgcgcgctgc  
 tgtgagagctgtcctgtgtgatctcgaggagcagacacctgaagagcctggatctcacg  
 gacaatgccctgggtgacggtgggttgcctgcactgtgcgagggtgaagcaaaagac  
 agtgtctgacgagactcgggttgaaggcatgtggactgacttctgattgtgtgaggca  
 ctctccttggcccttcttgcacccggcatctgaccagcttaaacctgggtgcagaaataac  
 ttcagtcccaaaggaatgatgaagctgtgttcggccttgcctgtcccacgtctaaacta  
 cagataattggcaatgactctgaagaaaatgacgttcttcgagaatctgctctagatt  
 ttgcttaaaagtcaactgttccaagaacctatcaatgacattaaaggagaacttactgtac  
 ctcccaaacctataacacgacccggcacagagactctgaggaaggaattcatggatgg  
 actgaaaggctgtggaaatggcagtaacctgtgcaaaataaggaagctgctggaggaagt  
 cagctactcaagcccgagtcgtaattgacggtagtggcattctttgatgaagatgac  
 cgattggatcttcaagccagcaaaacagtcactcagcaagacagacttacaatctcatg  
 gcatcacagaagtcatatcccatcaaccctgccacattccgtttggatagaagcactgct  
 gacggtgggaccggccacttccacatcgggggtcccgcctgtgggctgtagggtgttcagt  
 gacgtccctgctttacctgccaggtaagagatgaagtaggtatccttgttcacaacagc  
 caaagggtgcagacaacccacgtgtctatcagcagatga

1.18

&gt;NALP14/Py18 (mouse)

MGASLWYGPQ VVPVTGDQKF CLTLTPAHLA DFGFIWYKE LNKIEFMYFK ELLIHEILQM  
 GLKQISWTEV KEASREDLAI LLVKHCDGNQ AWDTTFRVFPQ MIGRNVITNR ATGEIAAHST  
 IYRAHLKEKL THDCSRKFNI SIQNFQDEY DHLENLLVPN GTENNPMMV LQGVAGIGKT  
 ILLKNLMIVW SEGLVFQNKF SYIFYFCCHD VKQLQTASLA DLISREWPS SAPMESILSQ  
 PEKLLFIIDS LEGMEWNVQ QDSQLCYNCM EKQPVNVLLS SLLRKKILPE SLLLISTSCE  
 TFKDLKDWR YTNVRTITGF KENNINMCFH SLFQDRNIAQ EAFSLIRENE QLFTVCQAPV  
 VCYMVATCLK NEIESGKDPV SICRRTTSLY TTHILNLFIP HNAQNPSNNS EDLLDNLCLF  
 AVEGMWTDIS VFNEEALRRN GIMDSDIPTL LDIGILEQSR ESENSYIFLH PSVQEFCAAM  
 FYLLHSEMDH SCQGVYFIET FLFTFLNKIK KQWVFLGCFY FGLLHETEQE KLEAFFGYHL  
 SKELRRQLFL WLELLLDTLH PDVKKINTMK FFYCLFEMEE EVFVQSAMNC REQIDVVVKG  
 YSDFIVAAYC LSHGSALTDF SISAQMC

&gt;NALP14/Py18.cDNA (mouse)

atgggtgcctccttatggatgggacctcaagttgtaccagtcactgggtgatcaaaagttc  
 tgcctcacccttaccacgacacatcttgagattttggctttatgggtactggaaagag

Forts. Fig. 1

ctaaacaagatagaattcatgtattttaaggaattactcatacatgaaattctgcaaatg  
 ggtctaaaacagatttcttggaactgaagtaaggaagcatctcgggaagaccttgccatc  
 ttactggtaaaacattgtgacgggaatcaagcctgggatacagaccttcagagctctccag  
 atgattgggaggaatgttatcactaatagggcaacaggagagattgctgcacactcaaca  
 atatatcgagctcatttaaaggagaagctgacccatgattgttctagaaagttcaacatc  
 agtattcagaatttctccaggatgaatatgatcatcttgagaaccttcttgtaccaaat  
 ggaactgaaaaaataccaaagatgggtgtctctgcaagggtgtagctggaattggcaagact  
 attctgttaaaaaattaatgattgtctgtcagaaggcctggatttccagaacaaatc  
 tcttatatcttctacttctgtctgtcatgatgtgaagcaattgcagacagcaagcctggct  
 gatctgatctccagagagtggtcctagccctcagctcccatggaggagatcctatcccaa  
 cctgagaaactcttattcatcattgacagcttagaagggatggaatggaatgttacccaa  
 caggattcgagctgtgttacaattgcatggagaagcagccagtaaatgtattgtgagc  
 agtttgctcaggaagaagataactccctgaatcatctctcctcatctccactagtgtgag  
 acttttaaggatttgaaggactggattgagtacacaaatgtgagaacaataaccggattc  
 aaggaaaacaatatataatgtgtttccacagcttgttccaagataggaacattgcccag  
 gaggccttcagtttgataagagaaaatgagcagctgttctactgtatgtcaggccctgtg  
 gctgtctacatgggtggctacttgtcttaaaaaatgagatagagagtggaagaccagtc  
 tccatctgcgcagctaccacctccctgtataccactcacatcttaaatttgttcatcccc  
 cacaatgccccaaaatccaagtaacaatagcgaagacctgtgtgataacttgtgtttctc  
 gctgtagagggcatgtggactgatatactgtgtttaatgaggaggctctaaggagaaat  
 gggatcatggattctgacatccccacactgtggatattggaattcttgagcagagcagg  
 gaattcgaataattctacatattctctccaccgtctgtccaggagtctgtgagggccatg  
 ttttatctgtacatagtgaattggatcactcttctcagggtgttactttatagaaaca  
 ttctgtttacttttctaaacaagatcaaaaaacagtggtttttttgggctgtttcttc  
 tttggtcttttacatgaaacagaaagaaagctggaggcattttttggctaccactta  
 tctaaagaattaaggcgacagctgtttttgtggtggaactcctattggacactttacat  
 cctgacgtaaaaaaaataaataccatgaagttctttactgtctgtttgagatggaagag  
 gaagctttgtacagtcagcaatgaactgtaggaacagattgacgttgtggttaagggt  
 tattctgattttattgttgtgctactgcttaagccatggctctgactgacagacttc  
 tccatttcagctcaaatgtgtga

1.19 >NALP15/Py19.hs  
 LEELKKEEPRKFKHEHLKQMTLQLELKQIPWTEVKKSIREELANLLIKHYEEQQAWNITLRIFQRM  
 DRKDLCKMKVMRERTGYT....  
 KYTKTYQAHAKQKFSRLWSS KSVTEIHLVF EEEVKQEECD HLDRLFAPKE AGKQPRTVII  
 QGPQIGIKTT LLMKLMMAWS DNKIFDRFL YTFYFCCREL RELPPTSLAD LISREWPDA  
 APITEIVSQP ERLLEVIDSF EELQGGLENEP DSDLCGDLME KRPVQVLLSS LLRKKMLPEA  
 SLLIAIKPVC PKELRDQVTI SEIYQPRGFN ESDRLVYFCC FPKDPKRAM AFNLVRESEQ  
 LFSICQIPLL CWILCTSLKQ EMQKGDAL TCQSTTSVYS SFVFNLFTE GAEGPTPQTQ  
 HQLKALCSLA AEGMWTDTFE FCEDDLRRNG VVDADIPALL GTKILLKYGE RESSYVFLHV  
 CIOEFCAALF YLLKSHLDHP HPAVRCVQEL LVANFEKARR AHWIFLGCFL TGLLNKKEQE  
 KLDAFFGFQL SQEIKQQIHQ CLKSLGERGN PQGQVDSLAI FYCLFEMQDP AFVKQAVNLL  
 QEANFHIIDN VDLVVSAYCL KYCSSLRLKLC FSVQNVFKKE DEHSSTSDYS LICWHHICSV  
 LTTSGHLREL QVQDSTLSES TFWTCNQLR HPSCRLQKLG INNVSFSGQS VILLFEVLIFYQ  
 PDLKYLSTFL TKLSRDDIRS LCDALNYPAG NVKELALVNC HLSPIDCEVL AGLLTNNKKL  
 TYLNVSCNQL DTGVPLLC EA LCSPTVLVY LMLAFCHLSE QCCEYISEML LRNKSRYLD  
 LSANVLKDEG LKTLCEALKH PDCCLDSLCL VKCFITAAGC EDLASALISN QNLKILQIGC  
 NEIGDVGVL LCRALHTTDC RLEILGLEEC GLTSTCCKDL ASVLTCSKTL QQLNLTNTL  
 DHTGVVVLCE ALRHPECALQ VLGLRKTDFO EETQALLTAE EERNPNLTIT DDCDTITRVE  
 I

>NALP15.hs.dna (partial)

gcccccgga aacctcagc ccccccaac tacggcagta cgagccgggtt aaatcgagc  
 agattatcat gttctgtca cgtctctga ggattggtat ctctgtcca gaaaagatgg  
 cagcctcttt ctgctctgat ttggtcttat gtggtatctg gaggagctca aaaaggagga  
 gttcaggaaa tttaagaac atctcaagca aatgacttgc agctgaactc aagcagattc  
 cctggactga ggtcaaaaa agcatcccg gaagaacttg caaacctctt gatcaagcac

Forts. Fig. 1

1.20

tatgaagaac aacaagcttg gaacataacc ttaagaatct ttcaaaagat ggatagaaag  
gatctctgca tgaaggtcat gagggagaga acaggatata caaagaccta tcaagctcac  
gcaaagcaga aattcagccg cttatggtcc agcaagtctg tcaactgagat tcacctatac  
tgtgaggagg aagtcaagca agaagaatgt gaccatttgg accgcctttt tgctcccaag  
gaaactggga aacagccacg tacagtgatt attcaaggac cacaaggaac tcggaaaaaa  
cgacactcct gatgaagctg atgatggcct ggtcggacaa caagatcttt cgggataggt  
tcgtgtacac gtgctatttc tgctgcagag aactgagg

&gt;NALP12/Py20.mmm\*

MTSVRCKLAQ YLEDLEDVDL KKFKMHLEDY PPEKGCIPVP RGQMEKADHL DLATLMIDFN  
GEEKAWAMAV WIFAAINRRD LWEKAKKQDP EWNDCCTSHS SMVCQEDSLE BEWMGLLGYL  
SRISICKKKK DYCKMYRRHV RSRFYSIKDR NARLGESVDL NSRYTQLQLV KEHPSKQERE  
HELLTIGRTK MRDSPMSSLK LELLFEPEDG HSEPVHTVVF QGAAGIGKTI LARKIMLDWA  
LGKLFKDKFD YLFFIHCREV SLRTPRSLAD LIVSCWPDEN PPVCKILRKP SRILFLMDGF  
DELQGAFDEH IGEVCTDWQK AVRGDILLSS LIRKLLPKA SLLITTRPVA LEKLQHLLDH  
PRHVEILGFS EAKRKEYFFK YFSNELQARE AFRLIQENEV LFTMCPIPLV CWIVCTGLKQ  
QMETGKSLAQ TSKTTTAVYV FFLSSLLQSR GGIEHLFSD YLQGLCSLAA DGIWNQKILF  
EECDLRKHGL QKTDVSAFLR MNVFQKEVDC ERFYSFST

&gt;NALP12/Py20.cdna

atgacgagtggtccgttgcaagctggctcagtatctagaggaccttgaagatgtggacctc  
aagaaattcaaaatgcatttgggaagattaccgcgccgagaaaggctgtatcccagctccc  
agggggccagatggagaaggcagatcacttggatctagccacactcatgattgacttcaat  
ggcgaggagaaggcctgggccatggctgtgtggatctttgctgcgatcaacaggcgagac  
ctctgggaaaaagctaagaaggaccagccagagtggatgacacgtgtacatcacattcc  
tctatgggtatgccaggaggacagccctgaagaagagtggatgggtttgctgggatatctc  
tcccgcatctccatttgtaaaaagaagaaagattactgtaagatgtacagacgacatgtg  
agaagcaggttctactctatcaaggacaggaacgcgcgtctaggtgagagtgtggacctc  
aacagtcgctacacgcagctccaactggtcaaggagcatccaagcaagcaggagcgggag  
catgaactcctgaccatcgccgggactaaaatgcgggacagccccatgagttcccttaag  
ctggagctgctgtttgagcccaggagcgggcactcggagcctgtgcacacagtggtgttc  
caggggagcagcagcgcctcgggaaaaccatcctagccaggaagattatgttggactgggca  
ctgggaaagctcttcaaaagacaaatttgactatttgttctttatccactgccgagaggtg  
agcctcaggacgccaaggagtctagcagacctgattgtcagctgctggcctgacccaaac  
ccaccagtgtgcaagatcctgcgcaagccttcaggatcctctctcatggatggcttt  
gatgagctacaaggggctttgacgagcacattggggaggtctgcacagactggcaaaag  
gctgtgcggggagacattctgctaagcagcctcatccgaaagaaactgctgccaaaggcc  
tctctgctcataacgacgagggcggtagccttggagaaactgcagcatctcctggaccac  
ccccgccatgtggagatcctaggtttctctgaggccaaaaaggaaggagtatttctttaag  
tatttctccaacgagctgcaggcccgaggccttcaggctgatccaagagaatgaggtc  
ctctttaccatgtgcttcatccccctggtctgctggattgtgtgcacggggctaaagcaa  
cagatggagaccgggaagagcctggccagacctccaagaccactacggcgtctacgtc  
ttcttctttccagcctgtgcaatcccgggggggcattgaggagcatctcttctctgac  
tacctacaggggctctgttcaactggctgcggatggaatttggaaaccagaaaatcctattt  
gaggagtgtgatctgcggaagcagcgcctgcagaagactgacgtctccgctttcctgagg  
atgaacgtgttccagaaggaagtggactgcgagagattctacagcttcagcacatga

\*\*\*\*\*

Fig. 2

## The PYD family summary

## A) Human proteins cloned and sequenced in our laboratory (NALP6 only partially)

Name	Old Name	EST	sequence	Chr. Locat.	Description
Pyrin ✓		No EST	From N. Tidow	16p13.3	PYD; B-Box; SPRY
Pycard ✓		>40	From ESTs	16	PYD; CARD
Pyc ✓		>3	From EST	16	PYD
NALP1 ✓		>20	From Kiaa		PYD; NACHT; LRR; X; CARD
NALP2 ✓	Py7	>30	From NEDO	19	PYD; NACHT; LRR
NALP6 ✓	Py9	>10	From EST (partial)	11	PYD; NACHT; LRR

## B) Human proteins partial sequences from genomic databases matching public ESTs

Name	Old Name	EST	sequence	Chr. Locat.	Description
NALP3 ✓	Py5	>3		19	PYD; NACHT; LRR
NALP7 ✓	Py11	3		19	PYD; NACHT; LRR
NALP10 ✓	Py14	1		2	PYD; NACHT; LRR
NALP11 ✓	Py15	3		19	PYD; NACHT; LRR
NALP15 ✓	Py19	>3		19	PYD; NACHT; LRR

Forts. Fig. 2

## C) Human proteins partial sequences from genomic databases matching no public human ESTs

Name	Old Name	EST	sequence	Chr. Locat.	Description
NALP4 ✓	Py6	1 pot from mouse		11	PYD; NACHT; LRR
NALP5 ✓	Py8			19	PYD; NACHT; LRR
NALP8 ✓	Py12			19	PYD; NACHT; LRR
NALP9 ✓	Py13			19	PYD; NACHT; LRR
NALP13 ✓	Py17			19	PYD; NACHT; LRR
Py10 ✓				11 or 3	PYD

## D) Mouse "new" proteins partial sequences from genomic databases matching no public ESTs apparently (1 est for NALP14 and 1 EST in a human sequence for NALP12 but no PYD for the moment in this partial human sequence)

Name	Old Name	EST	sequence	Chr. Locat.	Description
Py16 ✓					PYD .... interesting to follow
NALP12 ✓	Py20	-			PYD; NACHT; LRR
NALP14 ✓	Py18	1			PYD; NACHT; LRR

25/45

```

ID    PYD_DOMAIN; MATRIX.
AC    ZZ99999;
DT    Mon Oct 30 13:50:41 2000
DE    Generated from MSF file: 'stdin'.
MA    /GENERAL_SPEC: ALPHABET='ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ';
LENGTH=82;
MA    /DISJOINT: DEFINITION=PROTECT; N1=6; N2=77;
CC    Automatic scaling using medium database
MA    /NORMALIZATION: MODE=1; FUNCTION=LINEAR; R1=1.0442;
R2=0.01858709; TEXT='NScore';
MA    /CUT_OFF: LEVEL=0; SCORE=401; N_SCORE=8.5; MODE=1;
MA    /CUT_OFF: LEVEL=-1; SCORE=293; N_SCORE=6.5; MODE=1;
MA    /DEFAULT: M0=-8; D=-20; I=-20; B1=-60; E1=-60; MI=-105;
MD=-105; IM=-105; DM=-105;
MA    /I: B1=0; BI=-105; BD=-105;
MA    /M: SY='L'; M=-11,-28,-22,-29,-20,12,-29,-16,15,-
26,38,18,-28,-29,-17,-18,-28,-11,5,-9,7,-18;
MA    /M: SY='E'; M=-10,11,-28,19,39,-27,-17,-1,-29,10,-22,-
19,2,-5,13,4,2,-7,-26,-28,-15,26;
MA    /M: SY='E'; M=-12,22,-26,22,26,-24,-13,3,-26,3,-23,-
18,20,-11,13,-1,2,-7,-28,-31,-16,20;
MA    /M: SY='L'; M=-9,-30,-20,-31,-22,8,-31,-22,24,-
29,42,19,-29,-29,-21,-21,-27,-9,17,-21,-1,-22;
MA    /M: SY='S'; M=-2,5,-19,3,2,-21,-2,-8,-20,-4,-22,-16,10,-
11,-2,-5,14,6,-15,-33,-18,0;
MA    /M: SY='E'; M=0,2,-27,5,11,-30,-12,-2,-25,10,-24,-
13,0,1,10,1,0,-7,-21,-26,-15,9;
MA    /M: SY='D'; M=-14,17,-29,26,26,-25,-18,-1,-24,5,-20,-
18,5,-10,6,-3,-3,-9,-21,-28,-10,15;
MA    /M: SY='E'; M=-11,18,-28,24,45,-30,-16,2,-29,7,-23,-
20,11,-5,17,-1,2,-8,-30,-32,-20,31;
MA    /M: SY='L'; M=-12,-28,-19,-31,-22,30,-28,-19,11,-
29,33,11,-24,-29,-25,-19,-23,-8,6,-12,8,-22;
MA    /M: SY='K'; M=-11,1,-28,1,10,-26,-17,-3,-24,20,-22,-
7,1,-13,15,19,-3,-8,-20,-18,-10,12;
MA    /M: SY='K'; M=-10,-2,-26,-1,10,-23,-18,-6,-26,28,-24,-
12,0,-12,8,26,-2,-2,-18,-22,-8,7;
MA    /M: SY='F'; M=-19,-28,-21,-37,-27,70,-29,-19,-1,-
25,9,0,-19,-29,-36,-17,-20,-10,-1,7,26,-27;
MA    /M: SY='K'; M=-10,-2,-30,-3,8,-29,-21,-9,-25,41,-26,-7,-
1,-11,13,26,-10,-10,-18,-20,-9,10;
MA    /M: SY='F'; M=-9,-12,-23,-13,-1,2,-21,-5,-7,-7,-2,0,-9,-
17,-4,-7,-6,-5,-8,-18,1,-2;
MA    /M: SY='Y'; M=-12,-18,-25,-19,-11,6,-21,-10,-6,0,7,2,-
16,-23,-11,0,-19,-11,-6,-9,10,-11;
MA    /M: SY='L'; M=-10,-28,-21,-28,-16,7,-30,-20,20,-
28,43,18,-27,-27,-18,-20,-27,-10,10,-21,-1,-17;
MA    /M: SY='R'; M=-3,-13,-26,-14,-8,-17,-5,-12,-16,-1,-10,-
7,-9,-12,-4,1,-7,-7,-13,-15,-12,-7;

```



MA /M: SY='B'; M=-6,15,-20,14,5,-23,-13,-3,-23,0,-21,-  
 16,11,-12,2,-1,10,12,-17,-32,-14,3;  
 MA /M: SY='E'; M=-4,-9,-22,-10,5,-10,-21,-13,-10,3,-10,-5,-  
 9,-10,-4,1,-4,-1,-5,-22,-10,0;  
 MA /I: I=-4; MD=-18;  
 MA /M: SY='P'; M=0,-9,-18,-10,-5,-14,-9,-13,-6,-6,-11,-7,-  
 5,5,-4,-7,3,1,-6,-21,-12,-6; D=-4;  
 MA /I: I=-4; MD=-18;  
 MA /M: SY='L'; M=-8,-18,-10,-19,-11,-3,-24,-9,6,-18,19,10,-  
 18,-23,-8,-13,-15,-5,3,-23,-4,-10; D=-4;  
 MA /I: I=-4; MD=-18;  
 MA /M: SY='E'; M=-5,4,-23,8,23,-26,-10,-3,-25,7,-21,-15,2,-  
 7,13,8,4,-5,-21,-26,-16,17; D=-4;  
 MA /I: I=-4; MD=-18;  
 MA /M: SY='E'; M=-10,-6,-22,-4,6,-7,-18,-4,-13,0,-6,-4,-6,-  
 5,-2,-1,-7,-5,-12,-20,-6,2; D=-4;  
 MA /I: I=-4; MD=-18;  
 MA /M: SY='G'; M=-3,-2,-23,1,3,-23,21,-11,-27,-4,-21,-  
 15,0,-12,-5,-7,1,-8,-19,-22,-20,-1; D=-4;  
 MA /I: I=-4; MD=-18;  
 MA /M: SY='H'; M=-9,-10,-19,-11,-6,-1,-15,11,-6,-12,3,1,-  
 8,-17,-4,-8,-8,-3,-8,-14,8,-6; D=-4;  
 MA /I: I=-4; MI=0; MD=-18; IM=0; DM=-18;  
 MA /M: SY='P'; M=-6,-10,-21,-9,-4,-20,2,-11,-22,-3,-22,-  
 10,-5,4,0,-5,-1,-8,-20,-23,-17,-3; D=-4;  
 MA /I: I=-4; DM=-18;  
 MA /M: SY='R'; M=-10,-5,-26,-6,1,-22,-12,-6,-23,14,-21,-  
 11,0,-2,6,23,-3,-4,-19,-23,-14,1; D=-4;  
 MA /I: I=-4; DM=-18;  
 MA /M: SY='I'; M=-8,-26,-25,-32,-23,-1,-35,-27,36,-  
 25,17,14,-20,-21,-19,-25,-16,-4,25,-23,-3,-24;  
 MA /M: SY='P'; M=-2,-14,-30,-10,-2,-25,-17,-18,-18,-8,-25,-  
 17,-13,54,-8,-14,0,2,-21,-29,-25,-9;  
 MA /M: SY='W'; M=-16,-19,-37,-19,-8,-12,-20,-9,-22,3,-19,-  
 12,-16,-16,3,11,-19,-15,-24,42,5,-2;  
 MA /M: SY='G'; M=5,-4,-20,-7,-11,-14,17,-16,-24,-12,-21,-  
 16,2,-16,-13,-14,9,1,-15,-24,-17,-11;  
 MA /M: SY='E'; M=1,2,-24,3,22,-26,-15,-3,-22,5,-18,-13,0,-  
 2,13,0,3,-4,-21,-27,-17,17;  
 MA /M: SY='L'; M=-7,-29,-19,-31,-24,3,-30,-23,26,-  
 25,27,17,-27,-22,-21,-21,-21,-7,24,-24,-5,-24;  
 MA /M: SY='E'; M=-12,3,-29,8,24,-24,-18,0,-21,8,-13,-10,-  
 2,-10,10,4,-7,-11,-20,-26,-12,16;  
 MA /M: SY='K'; M=-5,0,-25,-2,9,-26,-14,-6,-23,20,-21,-7,1,-  
 11,13,14,-1,-2,-18,-23,-12,11;  
 MA /M: SY='A'; M=28,-14,-13,-23,-13,-11,-9,-17,0,-13,5,6,-  
 14,-15,-10,-18,-1,-1,3,-20,-13,-12;  
 MA /I: I=-6; MI=0; MD=-32; IM=0; DM=-32;  
 MA /M: SY='D'; M=-10,23,-23,27,5,-27,-6,-4,-26,-1,-26,-  
 21,18,-13,-1,-1,9,0,-21,-36,-18,1;

MA /M: SY='P'; M=-4,-13,-31,-11,-2,-23,-3,-15,-22,0,-22,-  
 14,-10,12,-6,0,-7,-12,-20,-15,-18,-6;  
 MA /M: SY='I'; M=-5,-15,-24,-16,-1,-11,-27,-17,9,-6,5,5,-  
 15,-16,-7,-11,-12,-8,8,-24,-9,-5;  
 MA /M: SY='D'; M=-14,26,-24,35,24,-35,-15,0,-32,8,-26,-  
 20,12,-10,12,-1,-1,-9,-28,-33,-18,18;  
 MA /M: SY='L'; M=-8,-29,-18,-30,-22,7,-29,-20,22,-  
 27,40,21,-29,-29,-20,-19,-26,-8,17,-22,-2,-21;  
 MA /M: SY='A'; M=31,-12,-10,-19,-13,-15,-9,-21,-3,-12,-7,-  
 7,-11,-14,-13,-18,10,9,9,-25,-17,-13;  
 MA /M: SY='D'; M=-11,14,-25,16,14,-19,-16,1,-21,-1,-18,-  
 15,10,-12,3,-4,2,-2,-20,-30,-12,8;  
 MA /M: SY='L'; M=-10,-24,-23,-26,-16,2,-30,-17,15,-  
 16,28,14,-23,-25,-13,-13,-23,-9,8,-18,2,-15;  
 MA /M: SY='L'; M=-10,-29,-20,-30,-20,12,-29,-17,19,-  
 27,44,24,-28,-29,-18,-19,-28,-10,10,-19,1,-19;  
 MA /M: SY='V'; M=-4,-16,-20,-17,-18,-8,-27,-19,15,-16,3,4,-  
 17,-16,-18,-18,-9,-1,20,-28,-9,-19;  
 MA /M: SY='S'; M=1,2,-20,-1,7,-22,-10,-9,-17,2,-20,-12,5,-  
 10,6,-3,10,7,-14,-29,-15,6;  
 MA /M: SY='H'; M=-13,-6,-24,-9,-7,-1,-21,29,-15,-6,-13,-  
 4,0,-21,0,-1,-4,-4,-15,-14,20,-6;  
 MA /M: SY='Y'; M=-13,-20,-12,-24,-21,31,-26,2,-5,-16,-2,-  
 4,-17,-28,-18,-15,-12,-7,-7,10,45,-21;  
 MA /M: SY='G'; M=-6,-7,-21,-4,-5,-22,11,-15,-24,-14,-18,-  
 15,-6,1,-12,-16,-3,-7,-21,-26,-20,-9;  
 MA /M: SY='E'; M=1,-1,-25,3,18,-27,5,-10,-28,-1,-24,-19,-  
 1,0,2,-8,7,-6,-23,-28,-22,9;  
 MA /I: I=-6; MD=-32;  
 MA /M: SY='E'; M=-8,2,-25,2,10,-21,-7,-3,-21,7,-20,-12,3,-  
 13,7,4,0,-6,-19,-21,-7,8; D=-6;  
 MA /I: I=-6; MI=-32; IM=-32; DM=-32;  
 MA /M: SY='Y'; M=-15,-8,-32,-5,0,-8,-21,0,-17,1,-14,-10,-  
 10,-15,5,2,-12,-11,-20,12,17,1;  
 MA /M: SY='A'; M=37,-13,-14,-21,-14,-18,2,-21,-5,-13,-8,-  
 7,-11,-13,-13,-21,5,-3,2,-20,-19,-14;  
 MA /M: SY='W'; M=-8,-30,-31,-30,-22,1,-18,-25,-4,-17,-4,-  
 7,-29,-27,-19,-15,-23,-16,-2,51,7,-19;  
 MA /M: SY='E'; M=-8,10,-24,12,14,-24,-13,-2,-21,7,-19,-  
 8,7,-11,8,4,2,-5,-19,-30,-15,11;  
 MA /M: SY='V'; M=2,-23,-15,-26,-20,-2,-24,-21,15,-  
 16,17,12,-23,-24,-18,-16,-12,0,20,-24,-7,-19;  
 MA /M: SY='T'; M=10,-7,-11,-14,-12,-11,-16,-20,-4,-12,-6,-  
 7,-6,-14,-12,-14,14,28,6,-29,-12,-12;  
 MA /M: SY='L'; M=-7,-26,-19,-30,-22,11,-28,-20,18,-  
 23,23,15,-23,-26,-20,-16,-18,-7,15,-19,0,-21;  
 MA /M: SY='N'; M=-6,7,-24,4,6,-26,-8,2,-24,8,-24,-13,12,-  
 13,11,8,6,-1,-22,-28,-14,8;  
 MA /M: SY='I'; M=-5,-25,-21,-31,-27,-2,-29,-28,31,-  
 24,12,11,-20,-22,-22,-24,-11,0,29,-24,-6,-27;

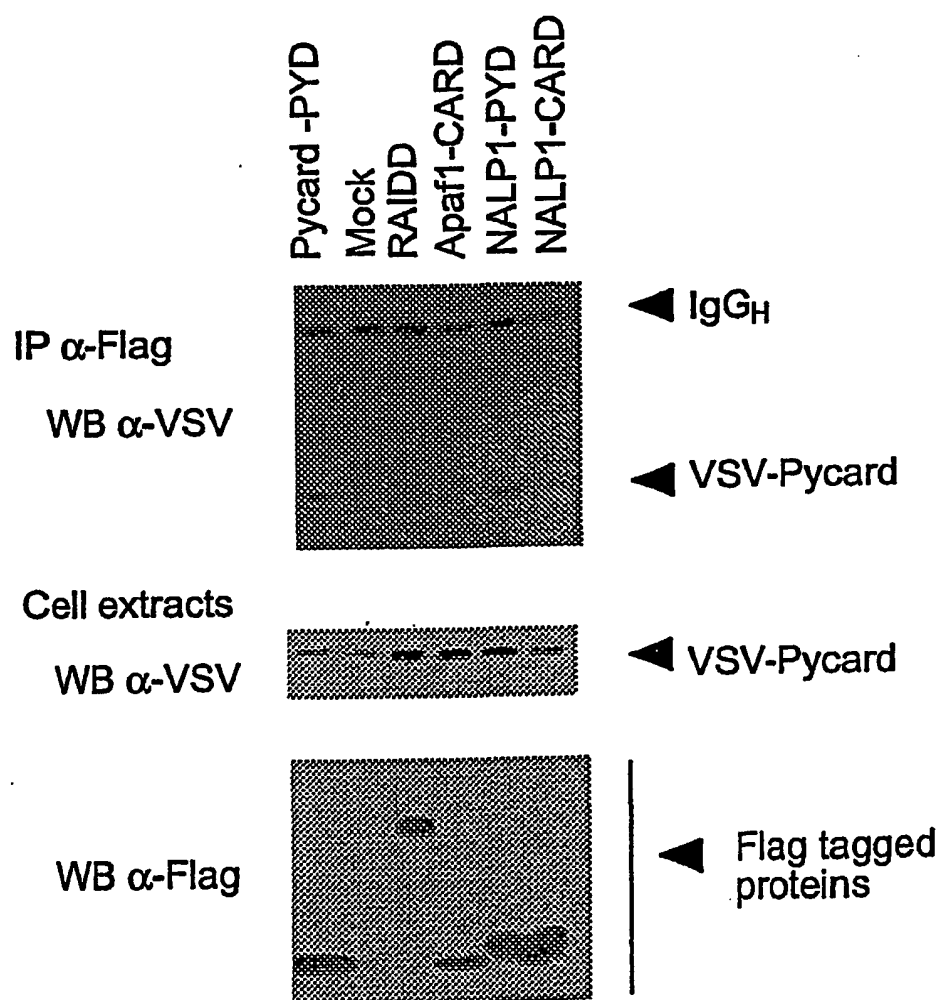
Fig. 3/3

```

MA  /M: SY='F'; M=-16,-30,-21,-36,-26,47,-30,-20,8,-
30,26,8,-25,-30,-31,-20,-25,-11,3,4,17,-25;
MA  /M: SY='R'; M=-8,-2,-27,0,18,-26,-15,-2,-25,15,-19,-11,-
1,-11,18,22,-2,-8,-22,-24,-14,16;
MA  /M: SY='K'; M=-4,2,-24,1,2,-23,-13,-8,-16,8,-15,-4,0,-
14,4,4,-4,-5,-12,-25,-13,2;
MA  /M: SY='M'; M=-7,-22,-21,-31,-21,-1,-24,-10,24,-
16,19,43,-19,-20,-7,-16,-18,-7,14,-20,-1,-15;
MA  /M: SY='N'; M=-10,21,-25,11,-2,-24,9,5,-27,3,-29,-
18,34,-19,-2,5,3,-7,-28,-32,-18,-3;
MA  /M: SY='L'; M=-10,-18,-5,-21,-12,-8,-25,-12,-5,-6,6,3,-
15,-25,-5,5,-16,-10,-5,-22,-5,-10;
MA  /M: SY='R'; M=-11,2,-24,-1,3,-19,-18,-3,-17,10,-13,-
3,5,-15,8,15,-3,0,-15,-26,-11,4;
MA  /M: SY='D'; M=-5,12,-24,18,16,-26,-15,-2,-22,-1,-16,-
15,3,-11,4,-7,2,-4,-17,-31,-15,10;
MA  /M: SY='L'; M=-9,-28,-19,-29,-19,6,-29,-19,21,-
26,39,21,-28,-28,-18,-19,-25,-9,15,-22,-2,-19;
MA  /M: SY='C'; M=16,-15,25,-22,-17,-16,-13,-22,-15,-17,-
15,-12,-13,-21,-16,-21,3,-1,-4,-19,-18,-16;
MA  /M: SY='E'; M=-2,6,-25,10,25,-26,-10,-7,-25,7,-20,-
16,1,-8,6,1,0,-7,-20,-28,-18,15;
MA  /M: SY='R'; M=-13,-2,-29,-1,12,-27,-20,-1,-23,21,-19,-
6,-2,-13,20,28,-6,-9,-19,-23,-11,15;
MA  /M: SY='L'; M=13,-22,-16,-26,-18,-4,-16,-22,9,-21,19,6,-
21,-22,-17,-21,-12,-6,10,-21,-10,-18;
MA  /M: SY='Q'; M=-11,-4,-27,-4,5,-25,-18,2,-17,8,-14,-3,-
2,-15,21,14,-5,-7,-18,-23,-8,11;
MA  /M: SY='E'; M=-5,3,-27,6,17,-26,-8,-2,-29,11,-21,-15,1,-
11,6,13,-2,-9,-22,-25,-16,11;
MA  /M: SY='E'; M=-5,5,-27,6,22,-24,-13,-1,-20,2,-17,-13,4,-
9,6,1,-1,-8,-19,-28,-15,13;
MA  /M: SY='M'; M=-2,-17,-6,-25,-18,-9,-23,-16,6,-10,2,14,-
14,-20,-9,-7,-8,0,7,-25,-9,-15;
MA  /M: SY='N'; M=-3,1,-22,-4,1,-16,-15,-7,-10,3,-8,-3,5,-
17,-2,2,-5,-6,-9,-27,-13,0;
MA  /M: SY='H'; M=-6,1,-28,3,21,-26,-11,24,-28,2,-20,-11,2,-
11,15,4,-3,-12,-26,-26,-8,16;
MA  /M: SY='S'; M=-3,-1,-19,-4,-7,-18,-1,3,-17,-6,-21,-
12,9,-18,-5,-1,10,0,-9,-32,-14,-7;
MA  /M: SY='V'; M=-4,-21,-18,-23,-22,6,-2,-22,0,-22,1,-2,-
16,-25,-24,-19,-6,-5,9,-20,-8,-22;
MA  /I: E1=0; IE=-105; DE=-105;
CC  /GENERATED_BY="/usr/molbio/bin/pfmake -2b -
/usr/molbio/share/pftools/blosum45.cmp H=0.6";
//

```

Fig. 4



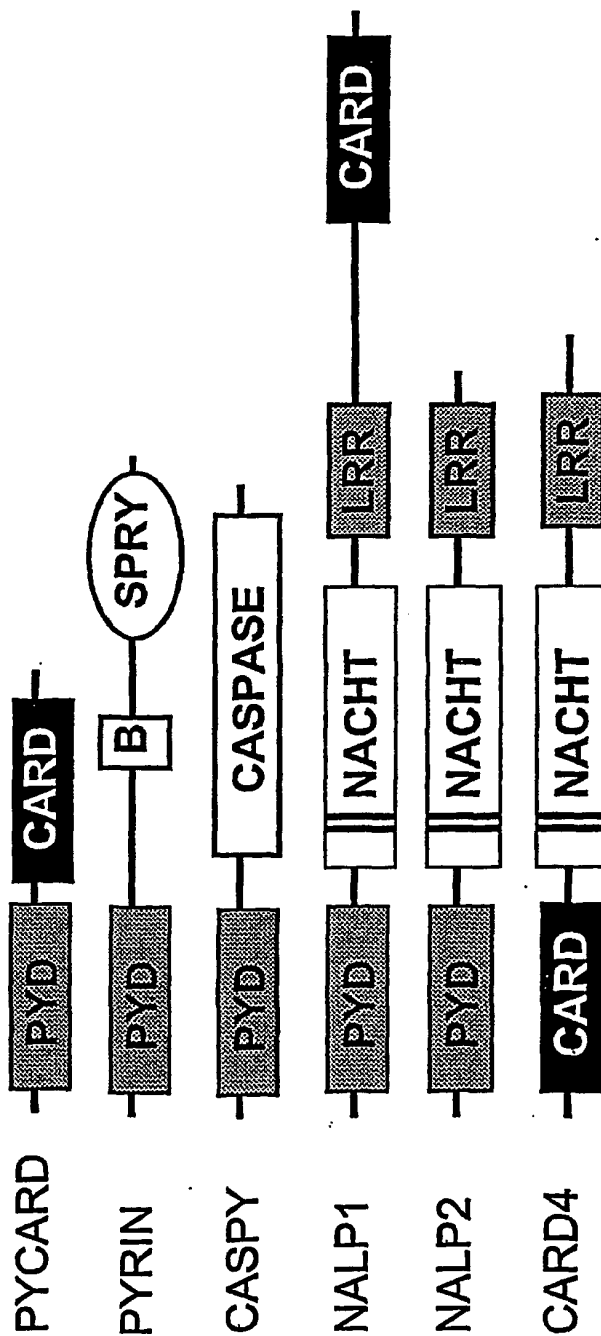
[illegible]

Fig. 5

MAGGAWRLACY  
PDTSGRRWREISASLLYQALPSSPDHESPSQESPNAPTSTAVLGSWGSPPPQPSLAPREQEAPGTQWPLDE  
TSGIYYTEIREREREKSEKGRPPWAAVVGTPPQAHTSLQPHHPWEPVSRESLCSITWPNKNEDEFNQKFTQ  
LLLQORPHPRSDPLVKRSPDYVEENRGHLIEIRDI  
WGRGQLYGDRFQHVYFSCRELAQSKVVSIAELIGKDGATAPAPIRQILSRPERLLFILDGVDEPGWVLQ  
EPSSELCLHWSQPADALLGSLGKTILPEASFLITARTTALONLIPSLQARWVEVLGFSESSRKEYF  
YRYFTDERQATRAFRLVKSNKELWALCLVPWVSWLACTCLMQQMKRKEKLTLSKTTTTLCLHYLAQALQ  
AQPLGPQLRDLCSLAAGIWQKKTLEFSPDDLKXGLDGAIISTFLKMGLLQEHPIPLSYSFHLCFQEFF  
AAMSYYLEDEKGRGKHSNC  
MQWVPSLQLLQPHSLESCLYETRNTFTLTQVMAHFEEMGMCVETDMELLVCTFCIKFSRHVKKLQLI  
EGRQHRSTWSPTMVVLFWRWVPTDAYWQILFSVLK  
GODLASVLSASPSSEKEHLEQONNEDVGVRELCEGERH  
LLIFSRRKPSVMTPTTEGLDTGEMSNSTSSLKRRQRLGSERAASHVAQANLKLDDVSKLFFPLAEIAEESPE  
VVPVELLCVPSPASQGDLTHTKPLGTTDDDFWGTGPVATEVVDKEKNLYRVHFPVAGSYRWPNTGLCFVMR  
EAVTVEIEFCVWDQFLGEINPQHSWMVAGPLLDIKAEPGAVEAVHLPHFVALQGGHVDTSLFQMAHFKEE  
GMILLEKPARVELHHIVLENPSFSPGLVLLKMIHNALRFIPVTSVLLYHRVHPEEVTFFHLYLIPSDCSIR  
KELELCYRSPGEDQLFSEFYVGHLCGIRLQVKDKDETIVWEALVKPGDIMPATLIPPARIAVPSPLD  
APQLLHFVDOYRBQLIARVTSVEVVLKHLHGQVLSQEQYERVLAEINTRPSOMRKLESLSQSWDRKCKDGL  
YQALKETHPHILTMELKSGSKKGLPLSS

PYD	Pycard	HS	12: L ENL PA E E K K F K L K I L S . . . . . V P E R E . G Y G R I P . G A L E S M E A . D L . . . . . T D K L V S F L E T Y G A L T . A . N M E R D . G I Q E M A G C H Q A A T
	Pytrin	HS	13: L E E L P Y D F E K F K F K L Q N . . . . . T S Q K . E H S R I P . S Q I Q A R P K M . . . . . A T L E T Y G E E Y A V Q L T . L . Q A E R A . N Q R L L A E E H R A A
DED	Caspas 8	HS	1: M D . . F S R N Y D G E Q M D S . . . . . E D F A S L K F S L D Y P O R Q P K D . . . . . A L M F F O R L Q E K R M L E S N L . S F K E L F F I N R L I L L I T Y
	FADD	HS	1: M D D P F L V L H S S S S S . . . . . S E T E L K F C I G K G R L R Q S . . . . . G L D F S M L L E Q N D L P O H T . E D E R E L A S L R R H D L L R R
	PER-15	HS	1: M V E . Y G T L F Q D T N N T L . . . . . E D L E Q L K S A C K E I P S E S E T T . . . . . G S A W F S F L E S H N K L K D N L . S M E H F F E I S R R P D L T M V
CARD	APAF-1	HS	5: A N C H L Q H R E A E K D K T S Y I M D H I S D G F T I S E E K A N P T Q Q . . . . . K A A M L K M I L K E D . . . . . N D S Y V . S F Y N A E L H E G Y K . L D A A L
	CED-3	CE	5: R R S L E R N M M F S S H K V D E I L E V I A K Q V E N D N G M N S C G T V R E . . . . . K R R E L K A V O R G . . . . . V A F D . A F Y D A F R S T G H E . G U A E V
	CED-4	CE	6: E C R A S T A H T R I H D F E P R D A L T Y E G K W I F T E D S L S K M S T R L E . . . . . R I A N F R I R R R Q A S . . . . . P M D F F Y N N Q S . H E A D F
DED	FAS	HS	204: S D V D S K Y T T T H A G V T L S . Q V K G F V R K N G N E A E E E M N N Q D T A . E Q K V Q I E R N H Q L H G K K E A Y D . T M K D K K A N I C . T A E K
	FADD	HS	93: G E E D C A A F N V C D N I G K D . . . . . W R R E A R Q L K S D T S E D R Y P R N L T . E R V R E S E R I K N T E K E N A T V A . H E N G A P R S Q M N . I A D I
	RIP	HS	579: T T S L T D K H D P R E N P G K H . . . . . W K N C A R K L G F T Q S Q E E E D H Y E R D G L K E K V Y Q E L K K V M R E G I K G A T V G M A Q A H Q C S R I D L S S L

Fig. 6

## The PYD Domain

Pyrin.hs	LE LVPY	FEKFKFKLQNTSL	QKHSRIPRSQ	QM	ARP	KATLL	TYGGEYAVQ	T	Q	LRA	NORLLA	E	HR
Pyrin.mm	LE LLPY	FEKFKFKLQNTSL	EKGHSKIPRGH	QM	ARP	KLASL	TYGGEYAVR	T	Q	LLRAT	NORQLA	E	HR
Pyrin.rn	LE LLPY	LEKFKFKLHTTSL	EKGHSRIPLSL	KM	ARP	KLTRL	TYGGEYAVR	T	Q	LLRAT	NORQLA	E	HR
Pycard.hs	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LS	MDA	DLTDKL	SYLETYAE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	
Pycard.mm	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LQ	MDA	DLTDKL	SYLESYLE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	
Pyc.hs	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LQ	MDA	DLTDKL	SYLESYLE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	
NALP1.hs	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LQ	MDA	DLTDKL	SYLESYLE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	
NALP2/Py7.hs	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LQ	MDA	DLTDKL	SYLESYLE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	
NALP3/Py5.hs	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LQ	MDA	DLTDKL	SYLESYLE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	
NALP4/Py6.hs	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LQ	MDA	DLTDKL	SYLESYLE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	
NALP5/Py8.hs	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LQ	MDA	DLTDKL	SYLESYLE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	
NALP6/Py9.hs	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LQ	MDA	DLTDKL	SYLESYLE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	
NALP7/Py11.hs	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LQ	MDA	DLTDKL	SYLESYLE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	
NALP8/Py12.hs	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LQ	MDA	DLTDKL	SYLESYLE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	
NALP9/Py13.hs	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LQ	MDA	DLTDKL	SYLESYLE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	
NALP10/Py14.hs	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LQ	MDA	DLTDKL	SYLESYLE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	
NALP11/Py15.hs	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LQ	MDA	DLTDKL	SYLESYLE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	
NALP12/Py20.mm*	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LQ	MDA	DLTDKL	SYLESYLE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	
NALP13/Py17.hs*	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LQ	MDA	DLTDKL	SYLESYLE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	
NALP14/Py18.mm	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LQ	MDA	DLTDKL	SYLESYLE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	
NALP15/Py19.hs	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LQ	MDA	DLTDKL	SYLESYLE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	
Py10.hs*	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LQ	MDA	DLTDKL	SYLESYLE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	
Py16.mm*	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LQ	MDA	DLTDKL	SYLESYLE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	
Casp11.ze	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LQ	MDA	DLTDKL	SYLESYLE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	
Casp21.ze	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LQ	MDA	DLTDKL	SYLESYLE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	
Pycard.ze	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LQ	MDA	DLTDKL	SYLESYLE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	
consensus	LE NLPY	LEKFKFKLHTTSL	REGYGRIPRGA	LQ	MDA	DLTDKL	SYLESYLE	TAN	LRDM	GLO	AGQ	QA	

Fig. 7



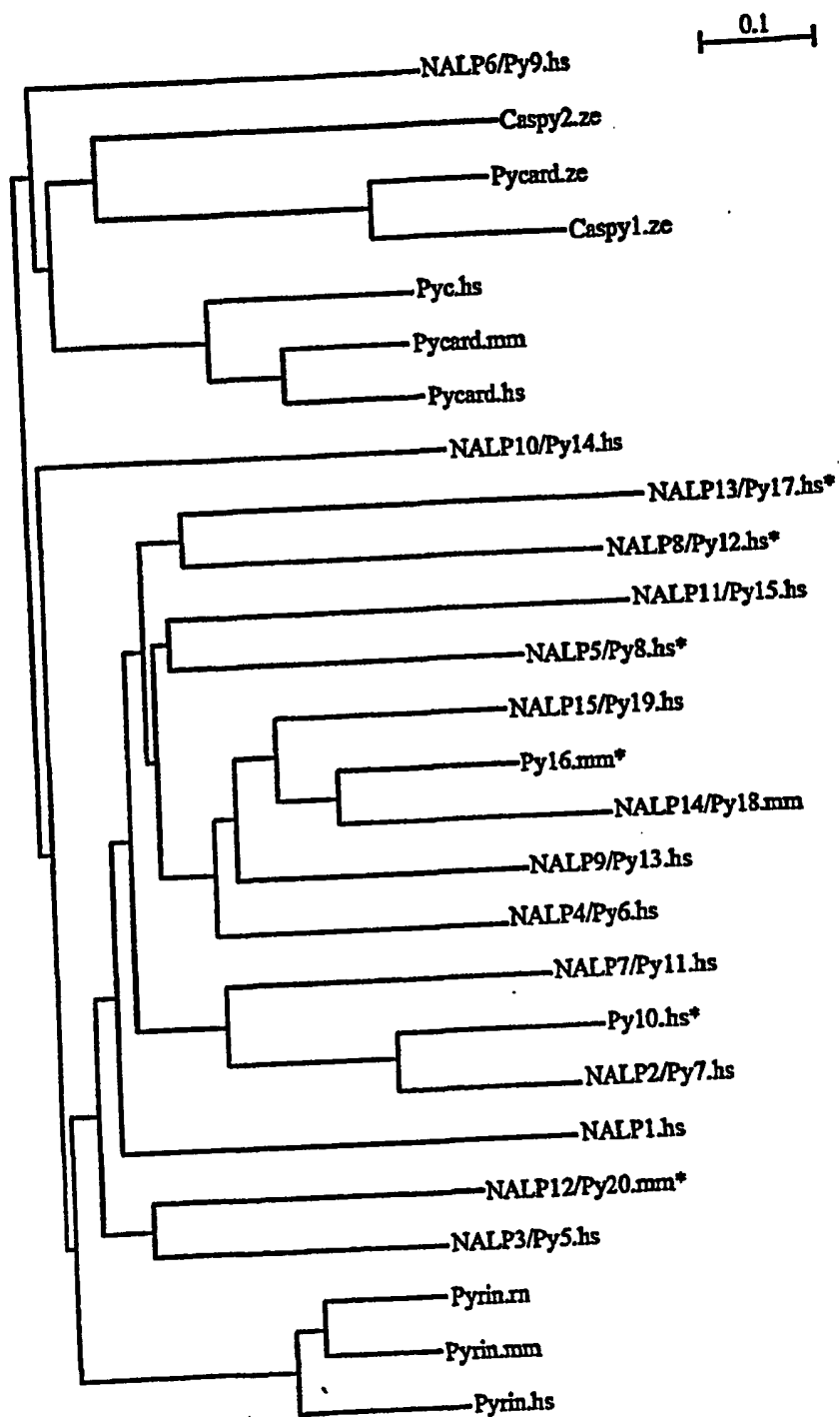


Fig. 8

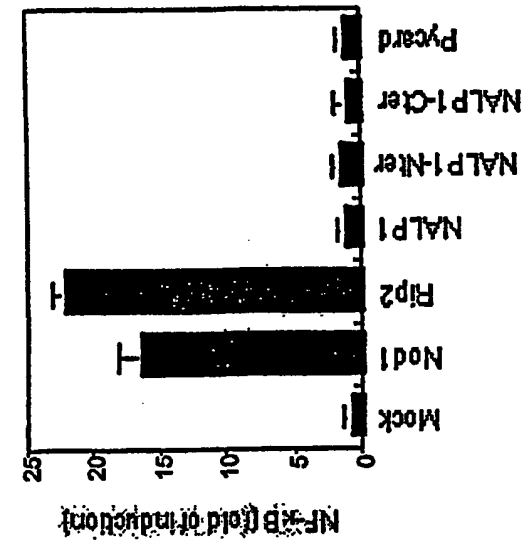
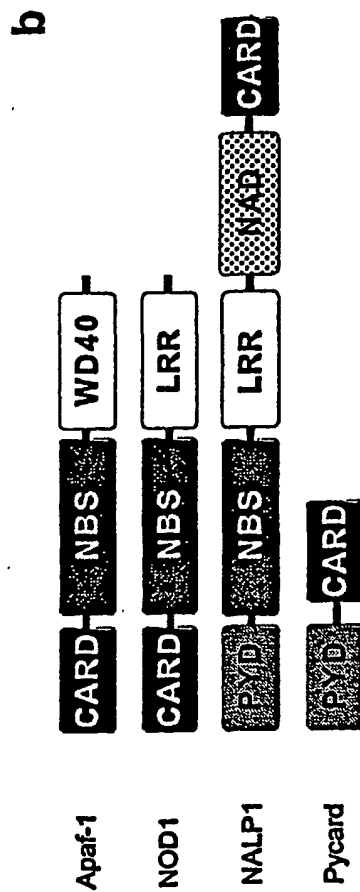
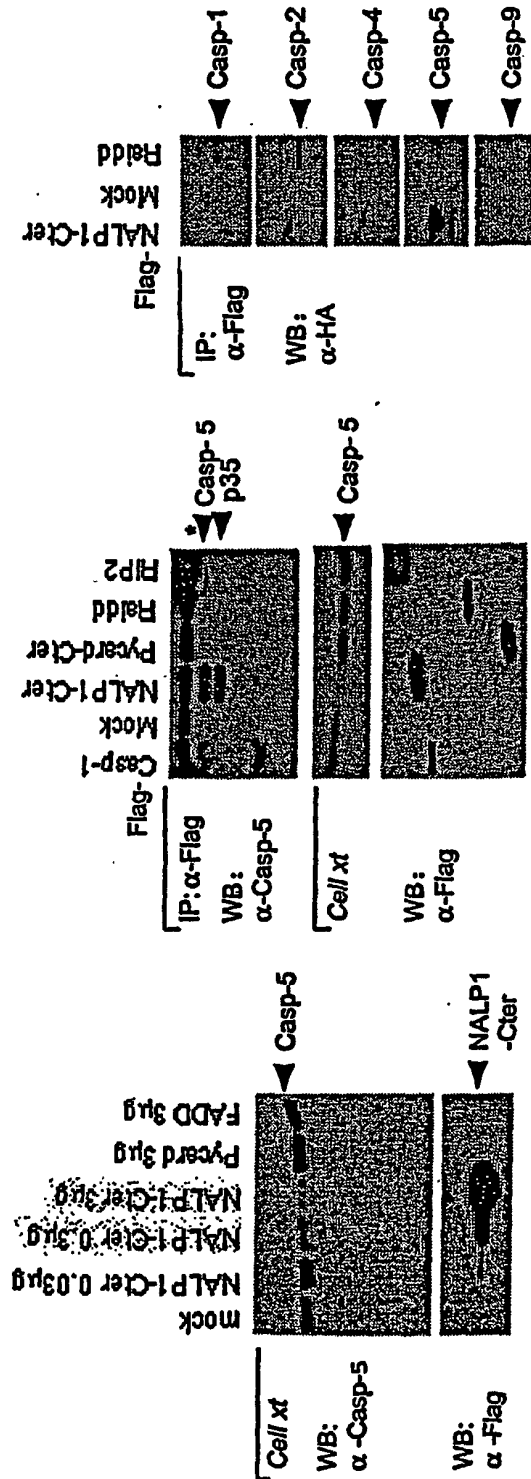


Fig. 9



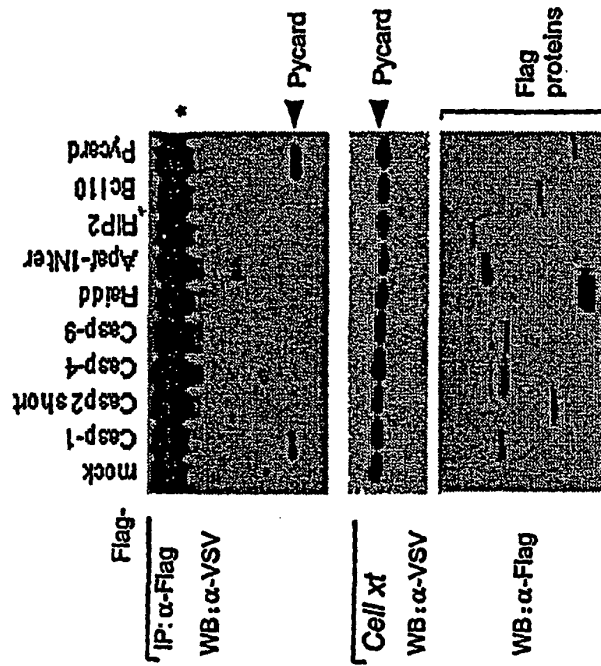
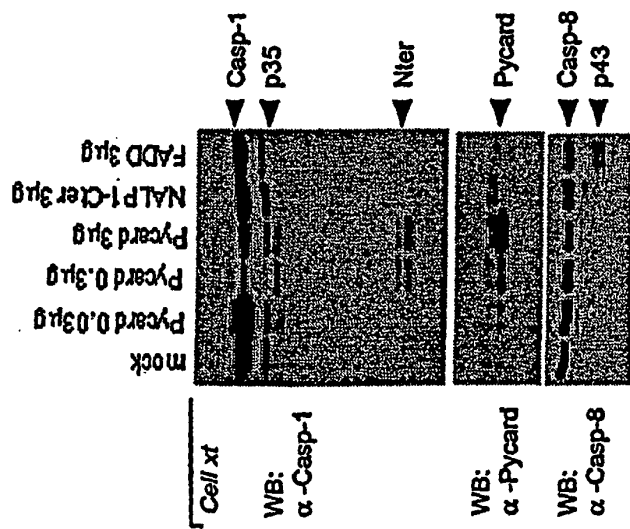
**b**



Forts. Fig. 9

C

d



Forsts. Fig. 9

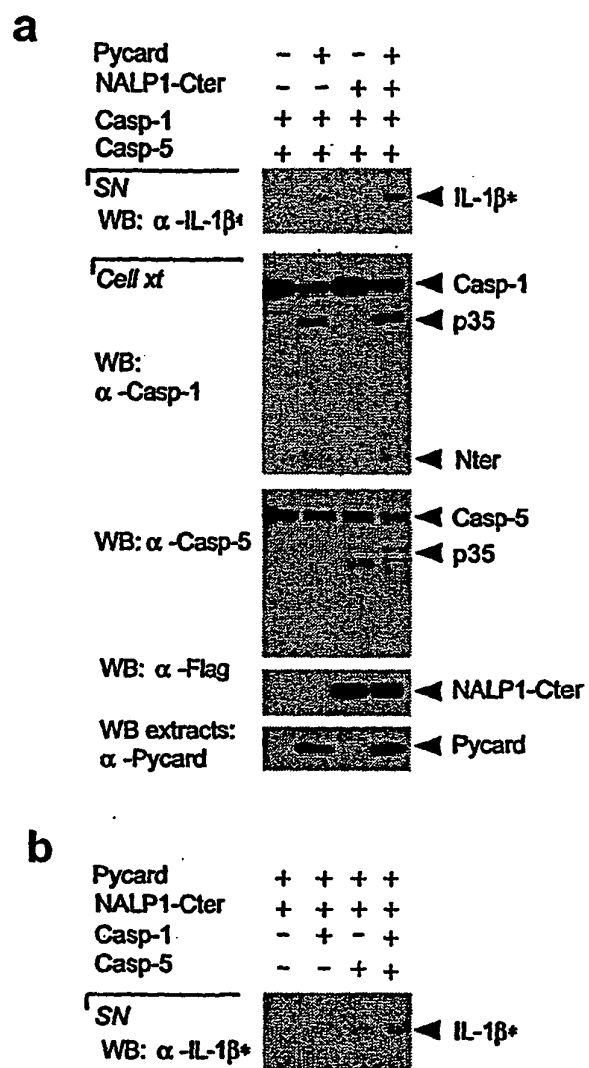


Fig. 10

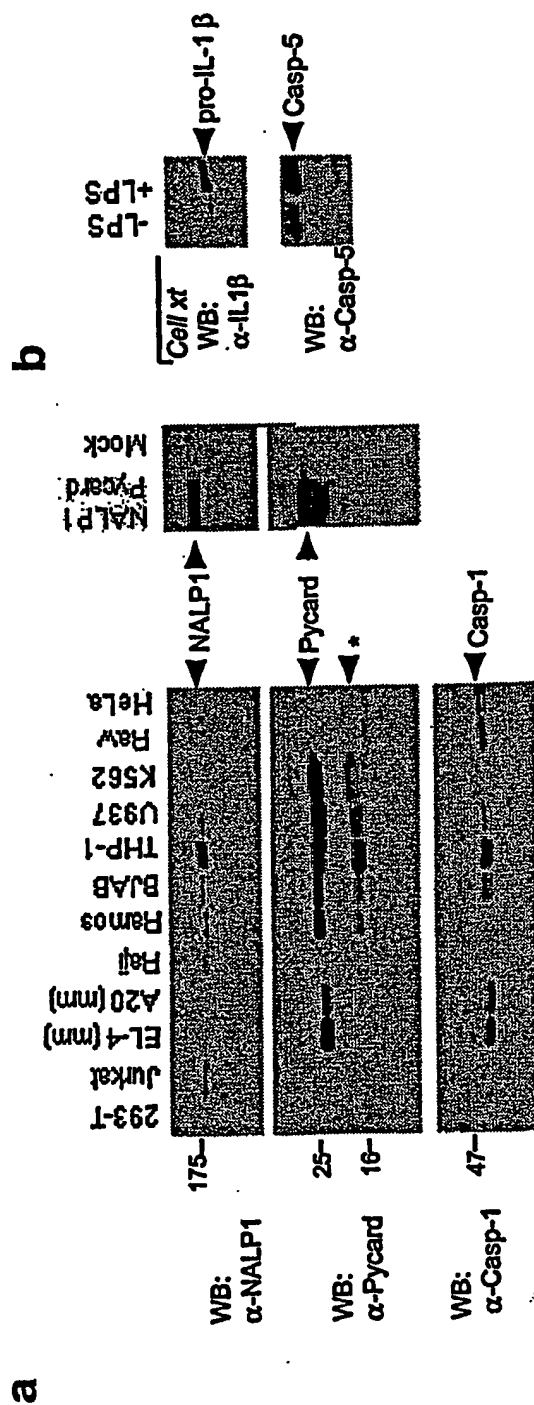
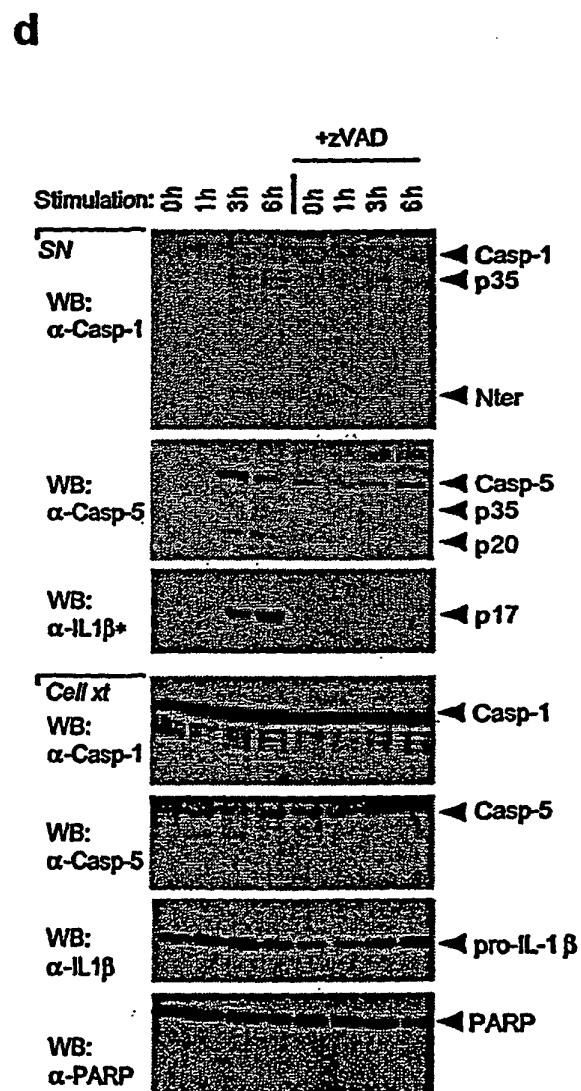
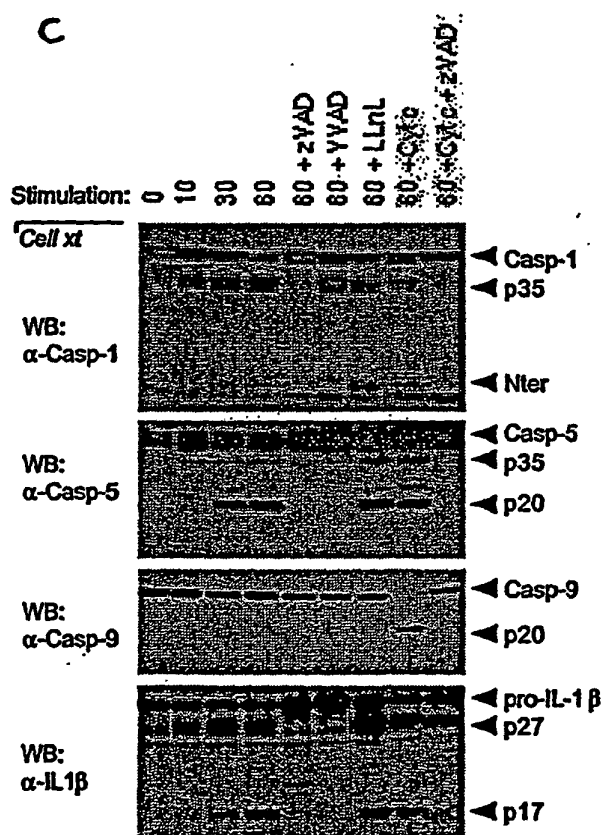


Fig. 11



Forts. Fig. 11

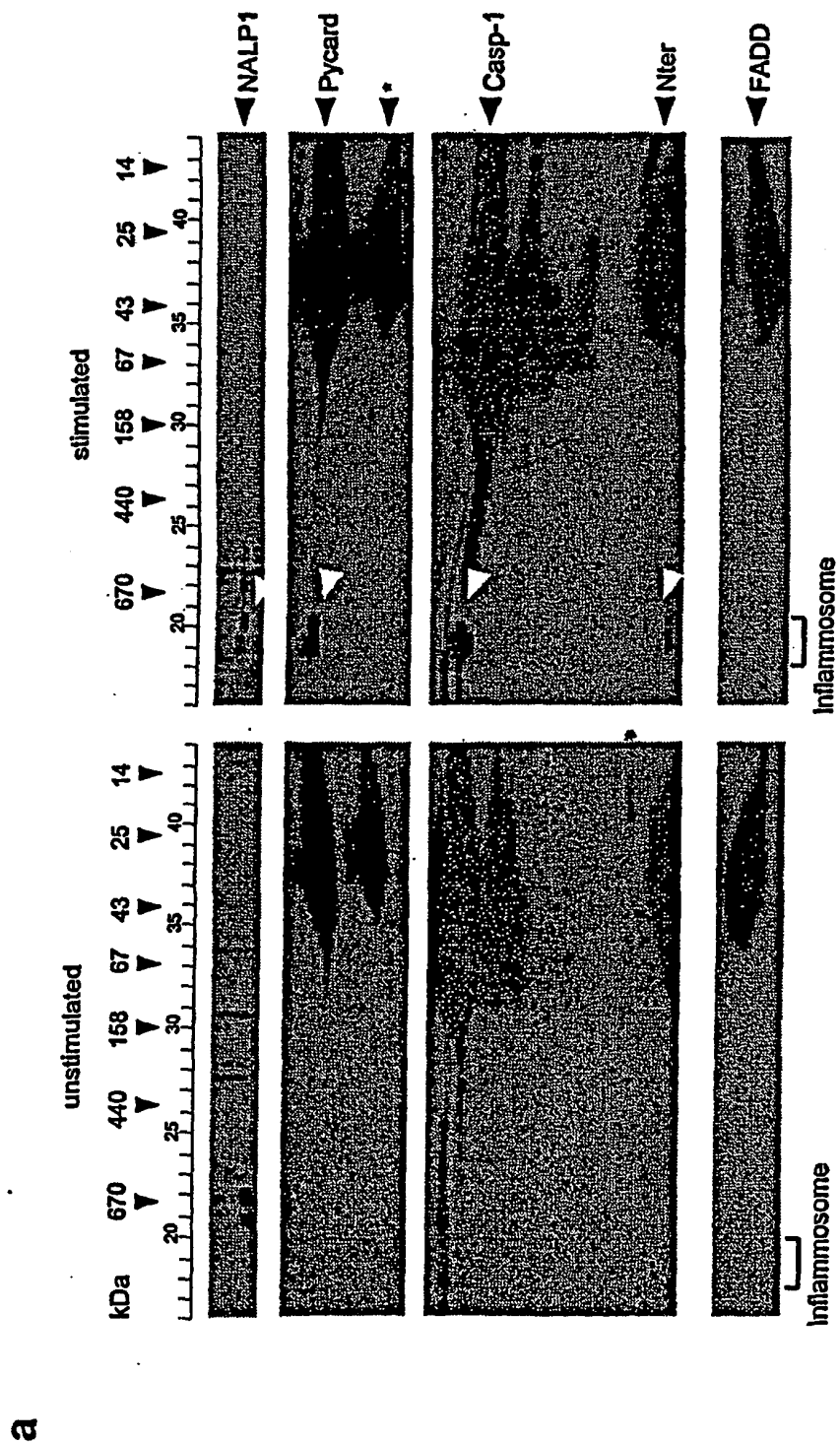
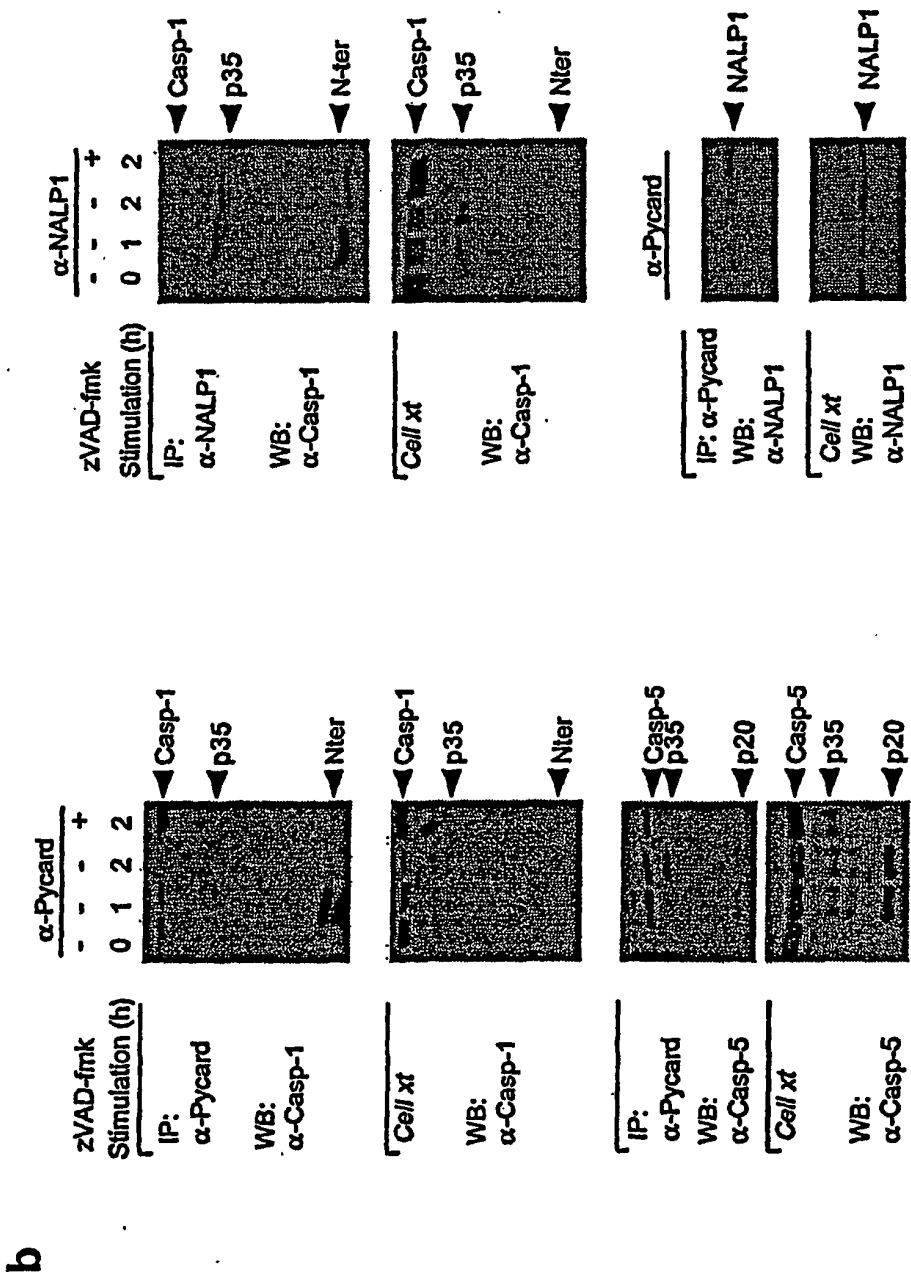


Fig. 12





Forts. Fig. 12

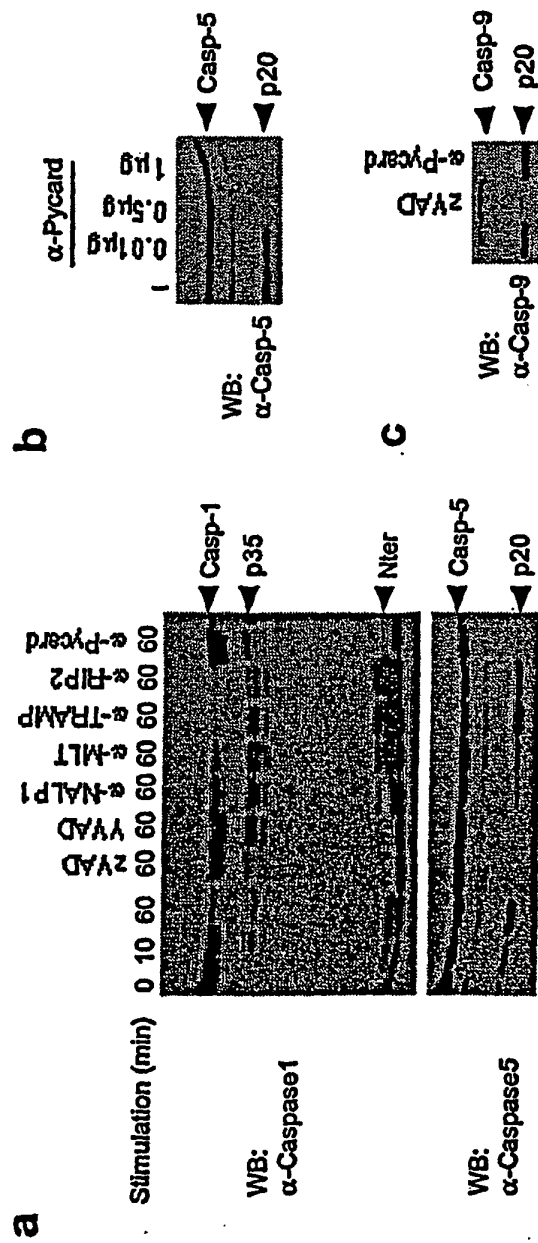


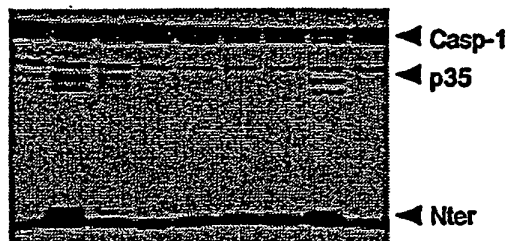
Fig. 13

Forts. Fig. 13

**d**

Immunodepletion:  $\alpha$ -control  $\alpha$ -Pycard  $\alpha$ -NALP1  
Stimulation (40 min): - + + - + - + - +  
Cytochrome c - - + - - + - - +

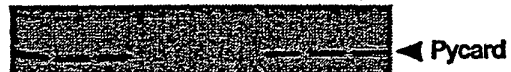
WB:  
 $\alpha$ - Caspase1



WB:  
 $\alpha$ - Caspase9



WB:  
 $\alpha$ - Pycard



WB:  
 $\alpha$ - NALP1



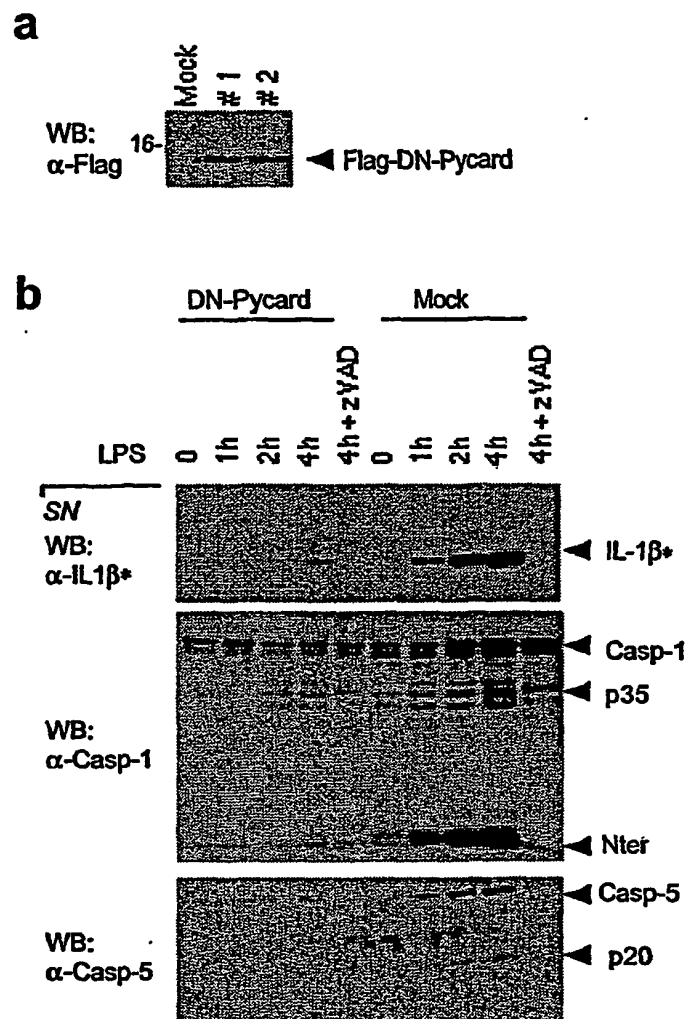


Fig. 14

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
23. Mai 2002 (23.05.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/040668 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/12, (72) Erfinder; und  
C07K 14/47, 16/18, A61K 48/00, 38/17 (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TSCHOPP, Jürg  
[CH/CH]; 10, ch. des Fontannins, CH-1066 Epalinges  
(CH). MARTINON, Fabio [IT/IT]; Valentin 30, CH-1004  
Lausanne (CH).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/12545
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
30. Oktober 2001 (30.10.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
100 56 687.1 15. November 2000 (15.11.2000) DE  
100 59 595.2 30. November 2000 (30.11.2000) DE
- (74) Anwälte: GRAF VON STOSCH, Andreas usw.; Bosch,  
Graf von Stosch, Jehle, Theatinerstrasse 8, 80333 München  
(DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,  
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,  
MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

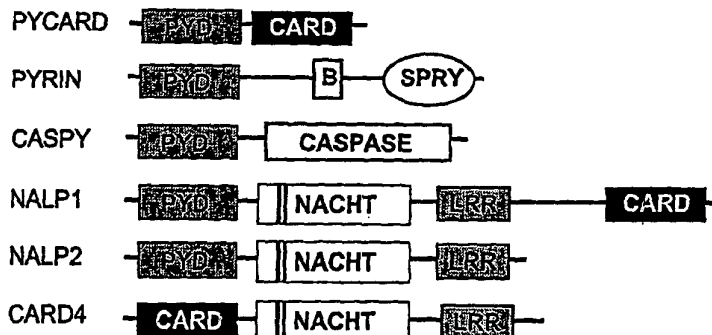
(54) Title: PROTEINS AND DNA SEQUENCES UNDERLYING THESE PROTEINS USED FOR TREATING INFLAMMA-  
TIONS

(54) Bezeichnung: PROTEINE UND DEN PROTEINEN ZUGRUNDELIEGENDE DNA-SEQUENZEN MIT FUNKTION BEI  
ENTZÜNDUNGSEREIGNISSEN

A

```
Pycard HS 12:EEEFPELEKFKMLSLVPTDEGYGRIPGALLSDADDDLVLPLEETAMDAVLRSGLENAGGQDAAT:89
Pyrin HS 13:EEVYVPERFPMQNTISGCHESRPESCHCAAFHATLLVYNGEPVQCLTLVLRNGRLAEEDER:90
NALP1 HS 11:EEFKKELDEGGLPQNTKHSRSSGRTAQPKTSGLSTLVAGYGESEAWDLAEHWEGGLRS:CAQAG:90
NALP2 HS 13:EESSQELERKYLITFYSAPSLQSPKKEADGKGLVLTNRCDSTVEHASELVEKLRMD:ERAK:90
CaspY DR 13:ESGADLRSTDSAD...QEPFTRSTDEDDLVLLVNTTS.DAVS...LDR...CHAGELLNT:87
Pycard DR 13:EEGADLRKFSGLD...QEPFTRSTDEDDLVLLVNTTS.DAVS...LDR...CHAGELLNT:88
consensus 1:*****j*****:80
```

B



(57) Abstract: The invention relates to DNA sequences, which code for at least one PYD domain, to expression vectors, which contain DNA sequences of this type, to host cells, which are transformed using expression vectors of this type, to purified gene products of said DNA sequences, to antibodies directed against said gene products, and to methods for isolating and/or expressing said gene products. The invention also relates to the use of said DNA sequences or of their gene products for treating inflammations.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 02/040668 A3



(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts:** 3. Juli 2003

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.*

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die für mindestens eine PYD-Domäne codieren, Expressionsvektoren, die derartige DNA-Sequenzen enthalten, Wirtszellen, die mit derartigen Expressionsvektoren transformiert sind, aufgereinigte Genprodukte der vorgenannten DNA-Sequenzen, Antikörper gegen für vorgenannten Genprodukte, sowie Verfahren zur Isolierung und/oder zur Expression der vorgenannten Genprodukte. Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der vorgenannten DNA-Sequenzen oder von deren Genprodukten zur Behandlung von Entzündungsereignissen.